



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

RODRIGO CASTRO

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS
PRÓ-ANGIOGÊNICA E ANTI-ANGIOGÊNICA
DO GENE *VEGF* E CONTROLE DE *SPLICING*
EM CÂNCER DE MAMA**

São José do Rio Preto
2013

Rodrigo Castro

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS
PRÓ-ANGIOGÊNICA E ANTI-ANGIOGÊNICA
DO GENE *VEGF* E CONTROLE DE *SPLICING*
EM CÂNCER DE MAMA**

São José do Rio Preto
2013

Rodrigo Castro

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS
PRÓ-ANGIOGÊNICA E ANTI-ANGIOGÊNICA
DO GENE *VEGF* E CONTROLE DE *SPLICING*
EM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

São José do Rio Preto
2013

Castro, Rodrigo

Análise de expressão de isoformas pró-angiogênica e anti-angiogênica do gene *VEGF* e controle de *Splicing* em câncer de mama

São José do Rio Preto, 2013

125p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo

1. *VEGF*; 2. Carcinoma de mama; 3. *Splicing*.

Rodrigo Castro

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS
PRÓ-ANGIOGÊNICA E ANTI-ANGIOGÊNICA
DO GENE *VEGF* E CONTROLE DE *SPLICING*
EM CÂNCER DE MAMA**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR

Presidente e Orientador: Eny Maria Goloni-Bertollo

1º Examinador: Luis Gustavo da Conceição Galego

2º Examinador: Angelo Gustavo Zucca Mathes

3º Examinador: Newton Antonio Bordin Junior

4º Examinador: Debora Ap. P. Campos Zuccari

Suplentes: Ana Elizabete Silva e Érika Cristina
Pavarino

São José do Rio Preto, 29 / 10 / 2013.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e símbolos	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	01
2. Metodologia.....	10
3. Artigos Científicos	16
Artigo 1. Angiogenesis, molecular and clinical therapy in breast cancer.....	18
Artigo 2 . Analysis of expressions of VEGF-A _{xxx} and VEGF-A _{165b} isoforms in breast cancer.....	42
Artigo3. Contribuição de Fatores reguladores no mecanismo de <i>splicing</i> alternativo do gene VEGF-A.....	70
4. Conclusões.....	94
5. Referências Bibliográficas	96
6. Anexos	103
Anexo I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP)	103
Anexo II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	104

Dedicatória

A minha esposa, Joice Elen dos Santos Castro, minha amiga, companheira, parceira, que na relação de troca e amor me ensina a viver de forma intensa. EU TE AMO!!!

Aos meus pais, José Antonio Castro e Vanilda Lopes Castro, pelo amor e infinitas horas de entrega, o meu amor eterno.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e bênçãos concedidas em cada momento de minha vida.

A professora Dra. Eny Maria Goloni Bertollo, pela orientação e por ter me dado a oportunidade de concretizar um sonho, meus sinceros agradecimentos pelo apoio, durante a realização deste trabalho

A Professora Dra. Érika Cristina Pavarino, pelo apoio em todos os momentos e correções tanto teóricas quanto práticas.

Aos professores da Pós-Graduação da FAMERP por compartilharem seus saberes. Minha admiração.

A profa. Dr. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari pela minha inserção no mundo acadêmico e por me mostrar sempre o melhor caminho a seguir, demonstrando mesmo em situações de adversidades que a amizade e o caráter vêm sempre em primeiro lugar. Minha admiração e respeito

Aos meus Amigos, Vitor Rafael Regiani, Tialfi Bergamin de Castro, Gustavo Henrique Marucci e Ana Livia Silva Galbiatti, pela ajuda em todos os momentos e pela amizade inquestionável.

A minha prima, Camila Takao Lópes, por toda ajuda com o inglês nos meus artigos e resumos de congressos, e principalmente por ser minha prima. Você é minha irmã oriental.

A minha Amiga, Patrícia de Matos Biselli Chicote, por todo auxílio em momentos de dúvidas e por ceder a idéia para este projeto, além de toda disponibilidade durante a execução e conclusão.

Aos meus Amigos e Amigas do LIMC (em especial ao Gustavo e a Larissa) que mesmo não participando diretamente do desenvolvimento e execução do projeto, me ajudaram e torceram por mim em todos os momentos.

Ao meu Amigo, Tiago Henrique, pelo companheirismo desde a graduação e por me ajudar em vários momentos de dificuldade durante a caminhada.

Ao meu colega de trabalho Leonardo, por toda ajuda na reta final desta pesquisa.

A minha colega de trabalho, Stephanie Piacente, pela ajuda na coleta das amostras durante o período.

Aos pacientes com câncer de mama, principal motivo da realização deste trabalho que me receberam com carinho e espírito de colaboração, meus sinceros agradecimentos.

A Instituição onde realizei o trabalho, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, ao qual muito me orgulho em fazer parte do corpo discente e que me proporcionou a realização deste grande sonho.

Aos diretores da FAMERP Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior e Prof. Dr. Dulcimar Donizeti de Souza, pelo respeito, confiança, incentivos constantes e acreditar na pesquisa.

A equipe da Ginecologia e Obstetrícia que tornou possível a concretização deste sonho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, biblioteca e todos os funcionários da FAMERP, obrigada pela convivência.

A todos os meus amigos por me ensinarem o tempo todo e incentivarem a alcançar outros vãos.

As colegas e amigas do Departamento de Biologia Molecular, pelo convívio e respeito;

Ao Sr. João, pelos momentos de descontração, aliviando a tensão diária e pelo cafezinho milagroso que movia nossa pesquisa.

A todos que torceram pela minha queda, me desculpe se os decepcionei e consegui.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP,
pelo suporte financeiro para a realização deste projeto.

Nada que se realiza no mundo se constrói sozinho. Meus sinceros
agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a
finalização desta pesquisa.

"Agradeço a todos que me disseram não, foi por isso que eu fui lá e fiz."

Albert Einstein

*Eu gosto do impossível porque lá a
concorrência é menor
(Walt Disney)*

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. VEGF pathway and VEGF inhibitors.....41

ARTIGO 2

Figure 1. Increased expression of VEGF-A_{xxx} gene (Black) compared to the normal pool (Gray Arrow) analysed through PCRq.....65

Figure 2. Increased expression of VEGF-A_{165b} gene (Black) compared to the normal pool (Gray Arrow) analysed through PCRq.....66

Figure 3. Increased expression of VEGF-A_{xxx} compared to normal tissue (Calibrator RQ=1).....67

Figure 4. Increased expression of VEGF-A_{165b} compared to normal tissue (Calibrator RQ=1).....68

Figure 5. Comparison of the expression of VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} isoforms.....69

ARTIGO 3

Figura 1. Expressão elevada de VEGF-A_{xxx} em tumores em relação ao tecido normal. O valor de RQ está apresentado em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....82

Figura 2. Expressão elevada do VEGF-A_{165b} em relação ao tecido normal. O valor de RQ está apresentado em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....82

Figura 3. Expressão elevada das duas isoformas em tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....83

Figura 4. Expressão de RNAm de SRPK1 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....83

Figura 5. Expressão de RNAm de ASF/SF2 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....83

Figura 6. Expressão de RNAm de SRp55 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. . Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1..... 84

Figura 7. Expressão de RNAm de SRp40 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. . Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.....84

LISTA DE TABELAS E QUADROS

ARTIGO 1

Tabela 1. Summary of drugs, their revealed targets and indications in clinical trails.....40

ARTIGO 2

Table 1. *Binary Logistic Regression.*Relation between VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} subtypes and tumor metastasis in breast cancer.....53

ARTIGO 3

Tabela 1. Correlação entre os fatores reguladores de splicing e as isoformas de VEGF-A em tumores de mama84

Tabela 2. Correlação entre SRPK1 e ASF/SF2, SRp55 e SRp40.....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
ASF/SF2	Serine/arginine-rich splicing factor
ATP	Adenosine Triphosphate
BC	Breast Cancer
BM	Bone Marrow
cDNA	Complementar Deoxyribonucleic Acid
CRC	Correctal Cancer
Cts	Cycle threshold
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen Receptor
ESEs	Splicing Enhancers
FAM	Carboxyfluorescein
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (<i>São José do Rio Preto Medical School</i>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (<i>São Paulo State Research Foundation</i>)
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto

GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GIST	Gastrointestinal Stroma Tumor
HIF-1	Hypoxia-Inducible factors
hnRNP	Heterogeneous Ribonucleoprotein Particles
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPRT-1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISEs	Splicing Intronic
mCRC	metastatic Colorectal Cancer
MM	Multiple Myeloma
mRCC	Metastatic Renal Cell Carcinoma
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MVD	Microvessel Density
NSCLC	Non small Cell Lung Cancer
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PR	Progesterone Receptor
RCC	Renal Cell Carcinoma
RNA	Ribonucleic Acid
ROX	Homeobox Gene Family
RPLPO	Large Ribosomal Protein
RT-PCR	Real Time Reaction Chain Polymerase
SRFs	Splicing Regulatory Factors
SRp40	Splicing Regulatory Protein
SRp55	Splicing Regulatory Protein

SRPK	SR protein kinases
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBP	TATA Binding Protein
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors
TNM	Classificação dos Tumores Malignos (<i>TNM classification</i>)
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (<i>Genetics and Molecular Biology Research Unit</i>)
US	United States
VEGF	Vascular Endotelial Growth FActor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Resumo

Introdução: O crescimento e progressão de tumores dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio vascular pré-existente. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF ou VEGF-A) é um potente mitógeno de células endoteliais e o aumento de sua expressão é associado com crescimento tumoral e metástase. Entretanto, a seleção do sítio alternativo de *splicing* na extremidade 3'. do éxon 8 do gene *VEGF* resulta em uma família-irmã de isoformas, VEGF-A_{xxx}b, que são anti-angiogênicas e *downregulated* em tecidos tumorais.

Objetivo: Analisar quantitativamente a expressão de isoformas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas do gene *VEGF* em 50 amostras de carcinoma mamário e tecidos normais adjacentes e determinar o efeito de proteínas reguladoras no controle do evento de *splicing* do gene *VEGF* e das proteínas reguladoras de *Splicing*, SRPK1, SRp40, SRp55 e ASF/SF2. **Material e Método:** A expressão das isoformas de VEGF-A_{xxx}, VEGF-A₁₆₅b e das proteínas reguladoras de *Splicing* foram analisadas em PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) utilizando amostras de 50 pacientes com câncer de mama e 43 amostras de tecido normal adjacente utilizados como controle. Os valores de Relative Quantification (RQ) foram utilizados nas associações com os subtipos moleculares e com metástase. Os dados foram submetidos ao teste da normalidade de *D'Agostino e Pearson normality test* utilizando o programa *GraphPadPrismv.6*. Os valores de quantificação relativa de RNAm (RQ) das isoformas de VEGF-A e das proteínas reguladoras de *splicing* em tumores foi analisada por *Wilcoxon Signed Rank Test*, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. Correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre os níveis de expressão de RNAm entre as proteínas reguladoras e as isoformas de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A₁₆₅b, onde valores de $P \leq$

0,05 foram considerados significantes. **Resultados:** Expressão significativamente elevada de ambas as isoformas VEGF-A_{xxx} (mediana de RQ = 7.7; P < 0,0001) e VEGF-A_{165b} (mediana de RQ = 2.9; P<0,0001) foi observada em tumores de mama em relação aos tecidos normais adjacentes. Quando comparados os valores de expressão de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} por meio do *Mann-Witney Test* que não apresentou diferença significativa de expressão das isoformas em tumores (P=0,0.65). A expressão do RNAm da proteína SRPK1 foi significativamente elevada em tumores de mama em relação aos tecidos normais (P<0,0001). Para ASF/SF2, SRp55 e SRp40 o RNAm também apresentou expressão significativamente elevada nos tumores (P<0,0001). As proteínas ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1 apresentaram correlação positiva com ambas as isoformas de VEGF-A. Encontramos também uma correlação positiva da proteína SRPK1 com todas as outras proteínas SR, principalmente com ASF/SF2. **Conclusão:** O mecanismo de *splicing* alternativo do gene VEGF-A resultando em isoformas anti-angiogênicas bem como pró-angiogênicas indica que a investigação de mudanças quantitativas da molécula VEGF-A em câncer e outras doenças pode não ser suficiente. Conforme demonstramos, a expressão das proteínas reguladoras de *Splicing* aqui estudadas, foram todas positivas quando comparadas com as isoformas de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b}.

Palavras chave: Angiogenese, Carcinoma de mama, *Splicing* alternativo

Abstract

Introduction : The growth and progression of tumors depend on angiogenesis , the process of formation of new blood vessels from a pre-existing endothelium . The vascular endothelial growth factor (VEGF or VEGF - A) is a potent mitogen for endothelial cells and increased expression is associated with tumor growth and metastasis . However, the selection of alternative splicing site in the 3 'end of exon 8 of the VEGF gene results in a sister family of isoforms , VEGF- A_{xxx}b , which are anti-angiogenic and downregulated in tumor tissues . **Objectives :** To assess quantitatively the expression of isoforms pro- angiogenic and anti- angiogenic VEGF gene into 50 samples of breast cancer and normal adjacent tissue and determining the effect of regulatory proteins to control the event splicing of the VEGF gene regulatory proteins and Splicing , SRPK1 , SRp40 , SRp55 and ASF/SF2 . **Methods:** The expression of VEGF-A_{xxx}, VEGF-A₁₆₅b isoforms and Splicing regulatory proteins were analyzed by PCR quantitative real-time (PCRq) using samples from 50 patients with breast cancer and 43 adjacent normal tissue used as controls . Values of Relative Quantification (RQ) were used in association with molecular subtypes and metastasis. The data were tested for normality D' Agostino and Pearson normality test using the program GraphPadPrismv.6 . The values of relative mRNA quantification (RQ) of the VEGF-A isoforms and splice regulatory proteins in tumors was analyzed by *Wilcoxon Signed Rank Test* , since the data is not normal distribution . Spearman correlation was used to evaluate the correlation between the levels of mRNA expression between regulatory proteins and VEGF-A_{xxx} and VEGF-A₁₆₅b isoforms where P values ≤ 0.05 were considered significant. **Results:** Expression significantly increased both isoforms of VEGF- A_{xxx} (median RQ = 7.7, P <0.0001) and VEGF- A₁₆₅b (median RQ = 2.9 , P <

0.0001) was seen in breast tumors compared to adjacent normal tissues . Comparing the values of expression of VEGF- A_{165b} and VEGF - A_{xxx} by the *Mann -Whitney test* that showed no significant difference in expression of isoforms in tumors (P = 0.065) . The mRNA expression of SRPK1 protein was significantly elevated in breast tumors compared to normal tissue (P < 0.0001). For ASF/SF2, SRp55 and SRp40 mRNA expression also showed significantly elevated in the tumors (P < 0.0001). Proteins ASF/SF2 , SRp55 , SRp40 and SRPK1 showed positive correlation with both isoforms of VEGF -A . We also found a positive correlation SRPK1 protein with all other SR proteins , mainly ASF/SF2. **Conclusion:** The concept of alternative splicing of the VEGF-A gene results in isoforms anti- angiogenic and pro- angiogenic research indicates that the quantitative changes in VEGF-A molecule in cancer and other diseases may be insufficient . As shown, the expression of splicing regulatory protein studied here were all positive as compared to the VEGF-A_{165b} and VEGF- A_{xxx} isoforms .

Key words: VEGF, Breast Cancer, *Splicing*

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

As pesquisas em câncer têm avançado rapidamente nas últimas décadas, mostrando ser uma doença que envolve alterações dinâmicas no genoma.⁽¹⁾ O grande objetivo no campo oncogenômico é tentar responder questões clinicamente relevantes, como quais tumores permanecerão inativos, quais pacientes necessitarão ou não de terapias sistêmicas e quais fármacos deverão ser utilizadas.⁽²⁾ Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama. Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*", e tem sido atribuída à menopausa.⁽³⁾

As estratégias de prevenção primária no controle dessa neoplasia ainda não é totalmente possível devido à variação dos fatores de risco e as características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Os fatores genéticos são reconhecidos como contribuidores do risco de desenvolvimento do câncer de mama.⁽⁴⁾ Tecnologias aplicadas aos estudos de DNA, RNA e do perfil das proteínas, podem ser usadas para retratar um fenótipo detalhado do tumor.^(2;5) O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais freqüente em mulheres em todo mundo,⁽⁶⁻⁷⁾ com incidência mundial crescente.⁽⁸⁾ A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979 e dados mostram que isso tem agravado.⁽⁹⁾ Na região Sudeste, o câncer de mama é

o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68/ 100.000. Sem considerar os tumores de pele não melanomas, esse tipo de câncer também é o mais freqüente nas mulheres das regiões Sul (67/ 100.000), Centro-Oeste (38/ 100.000) e Nordeste (28/ 100.000). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (16/ 100.000). Em 2008, 49.400 novos casos de câncer de mama eram esperados com um risco estimado de 51 casos por 100.000 mulheres.⁽⁹⁾ Estima-se que nas próximas décadas haja um grande aumento no número de mulheres diagnosticadas com câncer de mama e tratadas em países com recursos limitados.⁽¹⁰⁾ Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do carcinoma de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas.^(2;11) O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter marcada tendência à metástase a distância.⁽⁶⁾

O crescimento e progressão de tumores dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio vascular preexistente. Os tumores promovem a angiogênese por meio da secreção ou ativação de fatores angiogênicos, que estimulam a migração e proliferação endotelial e a morfogênese capilar. A avaliação da angiogênese no câncer de mama é de grande importância como um indicador-chave para sobrevida e para resposta à terapêutica.⁽¹²⁾ Os vasos recém-formados fornecem nutrientes e oxigênio ao tumor, aumentando sua disseminação. Assim, a angiogênese desempenha um papel fundamental na progressão do câncer e no surgimento de metástases.⁽¹³⁻¹⁵⁾

A formação de novos vasos é um processo complexo que envolve mais de 50 tipos de receptores, citocinas, enzimas e fatores de crescimento, muitos destes, membros da família do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A ou VEGF).⁽¹⁾ O

VEGF é um potente mitógeno de células endoteliais que promove a angiogênese. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que o aumento da expressão de VEGF está associado com crescimento tumoral e metástase, enquanto a inibição da sinalização do VEGF resulta em supressão da angiogênese e crescimento do tumor.⁽¹⁶⁾

O processo de vascularização tumoral e o momento exato do início da angiogênese ainda não é totalmente conhecido, mas o VEGF parece ser o fator de crescimento vascular predominante na maioria dos tumores.⁽¹⁷⁻¹⁸⁾ O aumento da expressão do VEGF está correlacionado com alguns tumores sólidos, tais como de mama,⁽¹⁹⁾ coloretal⁽²⁰⁾ e carcinoma espinocelular da cavidade oral.^(21; 22) Desde sua descoberta, em 1989⁽²³⁾, o VEGF tem sido considerado como o mais potente e importante fator de crescimento angiogênico em ambos os estados fisiológicos e fisiopatológicos.^(16;24) A superexpressão de VEGF resulta em aumento da angiogênese, enquanto a inibição desse fator resulta em inibição do processo angiogênico em situações normais e patológicas. Agentes anti-VEGF tem mostrado ser uma terapia eficaz contra o câncer⁽²⁵⁾ e outras condições angiogênicas.⁽²⁶⁾

Apesar destas importantes descobertas, pouco se sabe a respeito da regulação das diferentes isoformas de VEGF. A existência de um sítio alternativo de *splicing* na região 3' não traduzida do RNA mensageiro (mRNA), que resulta na expressão de isoformas com uma região C-terminal diferencial que podem ter efeitos inibidores e são *down-regulated* em tumores, sugere que o controle de *splicing* pode ser um importante mecanismo regulatório da angiogênese no câncer.⁽¹⁷⁾

Múltiplas isoformas de VEGF são geradas por *splicing* alternativo. As isoformas do VEGF convencional resultam de *splicing* do pré-mRNA de oito éxons, originando pelo menos sete tipos de mRNA e sete espécies de peptídeos identificadas pela

composição de éxons e tamanho de aminoácidos das proteínas finais.⁽²⁷⁾ Estas proteínas são amplamente estudadas e aceitas como vasodilatadores pró-angiogênicos.

A primeira isoforma descrita, o VEGF-A_{xxx}, é a forma dominante em estágios angiogênicos e tem sido extensivamente investigada para sua função, sinalização, expressão e outros papéis no câncer.⁽²⁸⁾

A seleção de um sítio alternativo de *splicing* na extremidade 3' do éxon 8 resulta em uma família-irmã de isoformas, denominadas VEGF-A_{xxx}b (Figura 1). As isoformas VEGF-A_{xxx}b possuem 94-98% de homologia com as isoformas VEGF-A_{xxx} e resultam da seleção de um sítio de *splicing* distal do éxon 8 na região C-terminal do pré-mRNA de VEGF, o que determina a divisão em dois sub-éxons (éxon 8a e éxon 8b).

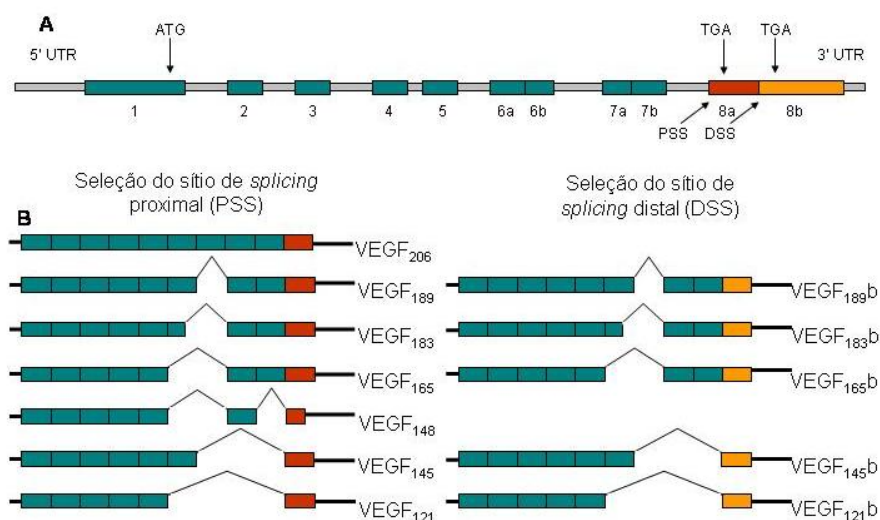


Figura 1. Estrutura de éxons do gene *VEGF* e variantes de *splicing* identificadas de VEGF-A. (A) Gene *VEGF* com dois sítios de *splicing* alternativo no éxon 8. (B) Duas famílias de isoformas de VEGF, VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{xxx}b.

Ambos os éxons 8a e 8b codificam para seis aminoácidos. O éxon 8a codifica para Cisteína - Ácido aspártico - Lisina - Prolina - Arginina - Arginina (CDKPRR); éxon 8b para Serina - Leucina - Treonina - Arginina - Lisina - Ácido aspártico (SLTRKD). Os resultados são peptídeos de mesmo tamanho, mas com seqüências de

aminoácidos diferentes na região C-terminal.^(29;30)

Os domínios de ligação ao receptor estão presentes na isoforma VEGF-A_{165b} (isoforma dominante), uma vez que ela atua como um inibidor competitivo de VEGF-A_{xxx}. Estudo de ligação a receptores mostra que o VEGF-A_{165b} se liga aos receptores VEGFR2 e Neurofilina 1 com a mesma afinidade do VEGF-A_{xxx}, mas parece não ativá-lo completamente.^(27;31) A ligação do VEGF-A_{xxx} aos receptores induz uma modificação conformacional no receptor VEGFR2, resultando em rotação interna do domínio intracelular. Essa ligação, após resultar em dimerização do receptor, leva ao reposicionamento do domínio kinase por rotação para dentro do dímero e, então, induz a autofosforilação. Em contraste, supõe-se que o VEGF-A_{165b} não exerça esse efeito de rotação completa, resultando em rápido fechamento do sítio de ligação de ATP (adenosina trifosfato) e rápida inativação e, conseqüentemente, a autofosforilação não é eficiente.^(15;32)

Essa região C-terminal alterada permite a inibição pelo VEGF-A_{165b} da proliferação endotelial, migração e vasodilatação induzidas pelo VEGF-A_{xxx}⁽¹⁷⁾, além da inibição da angiogênese fisiológica e crescimento tumoral.^(27;31;33) No entanto, esses efeitos são específicos para VEGF, uma vez que VEGF-A_{xxx}b não interfere na proliferação celular endotelial induzida pelo fator de crescimento de fibroblasto (FGF).⁽¹⁷⁾

Enquanto as isoformas VEGF-A_{xxx} são pró-angiogênicas e *upregulated* em tumores, as isoformas VEGF-A_{xxx}b são anti-angiogênicas e *downregulated* em tecidos tumorais, incluindo, carcinoma de próstata,⁽²⁷⁾ cólon⁽³⁴⁾ e células renais,⁽¹⁷⁾ e melanoma.⁽³⁵⁾ Além disso, observou-se que a expressão das variantes de *splicing* de *VEGF* estava alterada em fenótipos microvasculares angiogênicos de doença ocular

proliferativa na pré-eclampsia.⁽³⁶⁻³⁷⁾ Assim, o equilíbrio da expressão das isoformas de VEGF, que é controlada por *splicing* do mRNA, parece conduzir todo o mecanismo de angiogênese.⁽¹⁵⁾

A isoforma VEGF-A_{165b} mostrou-se um agente anti-angiogênico endógeno formado por *splicing* alternativo e, então, inibe as condições dependentes de angiogênese, como o crescimento tumoral.^(34;38) Estudos revelam que esta família de isoformas representa uma proporção substancial do VEGF total em tecidos normais^(27;37) compreendendo mais de 50% do total de proteína VEGF nos gânglios das raízes dorsais (71%), pulmão (82%), cólon (>95%), pele (>95%) e vítreo (66%). Estudos mostram que além da isoforma dominante VEGF-A_{165b}, as isoformas VEGF-A_{121b}, VEGF-A_{145b}, VEGF-A_{183b} e VEGF-A_{189b} também já foram identificadas.^(17;37)

Apesar da evidência de que existe um desequilíbrio na quantidade de isoformas pró e anti-angiogênicas de VEGF em uma variedade de doenças,^(17;27;36;37;39) pouco é conhecido sobre as vias celulares e moleculares que regulam o *splicing* alternativo do pré-mRNA de VEGF em geral e especificamente do sítio de *splicing* 3' dos éxons 8a / 8b.⁽³⁰⁾

O *Splicing* do pré-mRNA ocorre durante a transcrição⁽⁴⁰⁾ mediada pelo spliceosomo, um complexo de proteínas e RNA especializado.⁽⁴¹⁾ O mecanismo de *splicing* é influenciado por reguladores de *splicing* que ajudam a definir os éxons. Essas seqüências auxiliares incluem *enhancers* de *splicing* exônicos e intrônicos (ESEs e ISEs, respectivamente) e *silencers* de *splicing* exônicos e intrônicos (ESSs e ISSs). *Enhancers* de *splicing* são reconhecidos por fatores reguladores de *splicing* (SRFs), incluindo as hnRNP (*heterogeneous ribonucleoprotein particles*) e as proteínas SR. As proteínas SR são fatores de *splicing* que contêm uma seqüência de reconhecimento do

RNA e um domínio rico em serina e arginina; exemplo 9G8, ASF/SF2, SRp40, SRp55, entre outras.⁽²⁹⁾

O *splicing* de éxons depende do equilíbrio das atividades das proteínas SR. Dados recentes sobre regulação de *splicing* das isoformas VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{xxx}b mostram que os fatores ASF/SF2 e SRp40 favorecem a seleção de sítio de *splicing* proximal do pré-mRNA de *VEGF*, enquanto o fator SRp55 favorece a seleção distal, ou seja, a expressão de VEGF-A_{xxx}b. Foi observado que o fator SRp55 se liga a uma seqüência de 35 nucleotídeos da região 3' não traduzida imediatamente depois da região *stop codon* no éxon 8b, e que a utilização de *small hairpin RNAs (shRNA)* para silenciar o fator SRp55 demonstrou uma significativa *downregulation* tanto de SRp55 quanto de VEGF-A_{xxx}b. Esses resultados indicam que fatores como ASF/SF2, SRp40 e SRp55, regulam o *splicing* alternativo do pré-mRNA de *VEGF*, o que determina a região C-terminal.⁽³⁰⁾

Uma vez fosforiladas, as proteínas SR podem influenciar a seleção do sítio de *splicing* por mediar as interações entre os transcritos nascentes e os componentes do spliceossomo.⁽⁴²⁾ SRs podem ser regulados tanto diretamente (por proteínas SR kinases, como Clk1 ou SRPKs), ou indiretamente (por MAPKs e PKC). SRPKs fosforilam ASF/SF2, o que favorece o *splicing* proximal; já Clk1 resulta na fosforilação tanto de ASF/SF2 quanto de SRp55 e SRp40.⁽⁴³⁻⁴⁴⁾

Não existem dados na literatura sobre investigação de isoformas de VEGF e controle de *splicing* em câncer de mama. Assim, um melhor entendimento dos mecanismos de *splicing* de VEGF em tumores de mama poderia permitir a manipulação de muitas moléculas, além do VEGF, para transformá-las de pró-angiogênicas em moléculas anti-angiogênicas, que agiriam contra o tumor.

Objetivos

1. Analisar quantitativamente a expressão de mRNA das isoformas VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} em amostras de carcinoma mamário e em tecidos normais adjacentes.
2. Quantificar a expressão de mRNA de proteínas reguladoras de *splicing* e correlacionar com a expressão das isoformas de VEGF,
3. Relacionar a expressão das isoformas de VEGF-A com subtipos tumorais e metástase.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. Material

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 50 amostras de tecidos tumorais e 50 de tecidos adjacentes diretamente no centro cirúrgico do Hospital de Base de São José do Rio Preto, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO II). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo 6268/2009)(ANEXO I). As amostras passaram pelo processo de microdissecção para obtenção de tecido que apresente a neoplasia e do tecido adjacente. Esse material foi identificado e armazenado em nitrogênio líquido até a extração do RNA total.

3. Metodologia

3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

O RNA total criopreservado foi extraído do tecido mamário, pelo método de Chomezynski e Sacchi (1996)⁽⁴⁵⁾. Utilizando o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

As quantificações de RNA das amostras foram determinadas por sua absorbância em comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (*ThermoScientific*). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se o kit comercial *High-CapacitycDNA Reverse Transcription*, de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). Em uma reação de 20 μ l, foram utilizados 2 μ g de RNA total, desoxinucleotídeostri-fosfatados (dNTP) *mix* 1X, RT *randomprimers*1X, tampão 1X e 1ul de *Multiscribe Reverse Transcriptase*. Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min.

3.2 Análise de expressão gênica por q-PCR

As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços no equipamento *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)*, com a utilização de sondas *TaqMan MGB (Minorgroovebinder)* ligadas ao fluoróforo FAM (*Applied Biosystems*). Previamente à realização das quantificações de expressão dos genes alvo, foram avaliados 5 genes de referência (*Applied Biosystems*: GAPDH PN4333764F; β -actina PN4333762F; *HPRT1* PN4333768F; *TBP* PN4333769F; e *RPLPO* PN4333761F) por meio do software *DataAssist 3.0 (Applied Biosystems)*, utilizando a base de dados logarítmica do GeNorm⁽⁴⁶⁾. Os genes de referência que apresentaram menor variação entre os grupos de estudo e que foram selecionados para normalização dos dados de expressão gênica, de acordo com Vandesompele *et al* (2002)⁽⁴⁷⁾, foram *RPLPO* e *HPRT1*. Os cálculos de quantificação relativa foram realizados pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen, em 2001⁽⁴⁷⁾.

3.3.1 Teste para avaliação e escolha dos genes de referência

Com auxílio do software *DataAssist 3.0 (Applied Biosystems)* encontramos os dois genes que foram utilizados como controles endógenos das reações de expressão gênica de todas as amostras. A seleção dos melhores genes para controles endógenos foram feitas comparando o *Cycle threshold (Ct)* das amostras pelo software *DataAssist 3.0* utilizando a base de dados logarítmica do GeNorm, e os genes com os menores valores de estabilidade (abaixo de 1,5) foram os escolhidos (*RPLPO* (0,6488) e *HPRT1* (0,788))

3.3.2 Análise de expressão gênica por q-PCR

As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços no equipamento *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)*, com a utilização de sondas *TaqMan MGB (Minor groove binder)* ligadas ao fluoróforo FAM (*Applied*

Biosystems). As sondas *TaqMan* MGB contém o fluoróforo FAM ligado à extremidade 5' e um supressor (*quencher*) não fluorescente ligado à extremidade 3'. A intensidade de fluorescência na reação foi determinada pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ corresponde a intensidade de emissão do fluoróforo FAM/ intensidade de emissão do ROX em determinado momento; e Rn^- corresponde a intensidade de emissão do fluoróforo da sonda / intensidade de emissão do ROX antes da amplificação.

3.3.3 Análise de expressão da isoforma *VEGF-A_{xxx}* E *VEGF-A_{165b}*

Cinquenta amostras de tumores e um *pool* de amostras de tecidos normais apresentaram amplificação para a família *VEGF-A_{xxx}*. Para as amostras normais foi utilizado um *pool* contendo quantidades equivalentes de 43 das 50 amostras de tecidos normais devido a degradação do RNA de 7 amostras. O conjunto de *primers* utilizado detecta as isoformas 206, 189, 183, 165 e 148 de *VEGF-A_{xxx}*. As reações foram realizadas utilizando-se *TaqMan Gene Expression Master Mix 1x* (*Applied Biosystems*), 300nM de *primer* senso (5' AACACAGACTCGCGTTGCAA 3'), 100nM de *primer* anti-senso (5' CGCCTCGGCTTGTCACAT 3') (e 250nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM (5' AGCTTGAGTTAAACGAAC 3') a ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min. Para análise de expressão do *VEGF-A_{165b}*, foram utilizados o mesmo *primer* senso e sonda de *VEGF-A_{xxx}*, conforme descrito acima. O *primer* anti-sense específico para a região 8b (5' TTCCTGGTGAGAGATCTGCAAGTA 3') foi desenhado com auxílio do software *PrimerExpress* versão 3.0 (*Applied Biosystems*) e detecta somente a isoforma *VEGF-A_{165b}*. As reações de amplificação para isoforma *VEGF-A_{165b}* foram realizadas com 10ul de *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*), 900 nM de cada *primer* senso e anti-senso e 250 nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM. A ciclagem

compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 45°C por 1 min.

3.3.4 Análise de expressão dos fatores reguladores de *splicing*

Para análise da expressão de RNAm dos fatores reguladores de *splicing* *SRp55*, *SRp40* e *ASF/SF2*, foram desenhados pela empresa *Applied Biosystems* primers e sondas de acordo com as sequências do DNA complementar depositadas no *NCBI* (*SRp55*: NM_006275; *SRp40*: NM_001039465.1; *ASF/SF2*: NM_001078166.1). O ensaio *TaqMan Gene Expression Assays - Assay-on-Demand* (*Applied Biosystems*, Assay ID Hs00177298_m1) foi utilizado para análise do gene *SRPK1*.

As reações foram realizadas utilizando-se 100ng de cDNA, *TaqMan Gene Expression Master Mix 1x* (*Applied Biosystems*) e os *primers* e as sondas específicas para cada gene alvo, na concentração final de 1X. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min.

O cálculo da quantificação relativa de todos os genes foi feito pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen, em 2001⁽⁴⁸⁾. Amostras de tecido normal (*pool*), foram utilizadas como calibrador e *HPRT1* e *RPLPO* como genes de referência. O software *CFX Manager™* software, *qbase^{PLUS}* foi utilizado para analisar as curvas de expressão.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Anteriormente à realização de testes utilizando dados contínuos, os dados foram submetidos ao teste da normalidade de *D'Agostino e Pearson normality test* utilizando o programa *GraphPad Prism v.6*. Os valores de quantificação relativa de RNAm (RQ) das isoformas de VEGF-A e das proteínas reguladoras de *splicing* em tumores foi analisada por *Wilcoxon Signed Rank Test*, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. Correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre os níveis

de expressão de RNAm entre as proteínas reguladoras e as isoformas de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b}, em que valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigo. No total estão apresentados 03 artigos, sendo que dois foram submetidos e encontram-se em análise, um aguarda a contribuição da banca para submissão.

Artigo 1:

Título: Angiogenesis, molecular and clinical therapy in breast cancer.

Autores: **Rodrigo Castro;** Tialfi Bergamin de Castro; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari; Leonardo Prado Stuchi; Érika Cristina Pavarino; Eny Maria Goloni Bertollo.

Periódico: International Journal of Cancer

Artigo 2

Título: EXPRESSION ANALYSIS OF VEGF-A_{xxx} AND VEGF-A_{165b} ISOFORMS IN BREAST CANCER

Autores: **Rodrigo Castro;** Patrícia Matos Biselli-Chicote; Tialfi Bergamin de Castro; Leonardo Prado Stuchi; Stephanie Piacenti dos Santos; Newton Antonio Bordin Junior; Érika Cristina Pavarino; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Eny Maria Goloni-Bertollo

Periódico: Breast Cancer Research

Artigo 3

Título: Contribuição de Fatores reguladores no mecanismo de *splicing* alternativo do gene VEGF-A

Autores: **Rodrigo Castro;** Patrícia M. Biselli-Chicote; Tialfi B. Castro; Leonardo P. Stuchi; Newton A. Bordin-Junior; Dalísio S. Neto; Stephanie Piacenti dos Santos; Érika C. Pavarino; Debora A. P. C. Zuccari e Eny M. Goloni-Bertollo

Periódico: Molecular Biology Reports

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Título: Angiogenesis, molecular and clinical therapy in breast cancer.

Autores: Rodrigo Castro; Tialfi Bergamin de Castro; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari; Leonardo Prado Stuchi; Érika Cristina Pavarino; Eny Maria Goloni Bertollo.

Periódico: International Journal of Cancer

Comprovante de Submissão

International Journal of Cancer



International Journal of Cancer

Angiogenesis, molecular and clinical therapy in breast cancer

Journal:	<i>International Journal of Cancer</i>
Manuscript ID:	IJC-13-2593
Wiley - Manuscript type:	Mini Review
Date Submitted by the Author:	27-Sep-2013
Complete List of Authors:	Castro, Rodrigo; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology de Castro, Tialfi; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology Zuccari, Debora; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology Stuchi, Leonardo; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology Pavarino, Érika; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology Goloni-Bertollo, Eny; FAMERP - São José do Rio Preto Medical School, Molecular Biology
Key Words:	Breast Cancer, Angiogenesis, Therapy, VEGF

SCHOLARONE™
Manuscripts

ew

Angiogenesis, molecular and clinical therapy in breast cancer

R. Castro – T. B. Castro – D. A. P. C. Zuccari – L. P. Stuchi - E. C. Pavarino – E. M. G. Bertollo

Corresponding author: Castro, Rodrigo

Address: Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000

São José do Rio Preto – São Paulo

Brazil

E-mail: rodrigocastro@famerp.br

Phone/ Fax: +55 (17) 3201 5907

Key Words: Breast Cancer; Angiogenesis; Therapy; VEGF

Abbreviations used:

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

TKIs: Tyrosine Kinase Inhibitors

ECM: Extracellular Matrix

ANGPTL4: Angiopoietin-like 4

CRC: Colorectal Cancer

MVD: Intratumoural Microvessel Density

RCC: Renal Cell Carcinoma

Manuscript category: Mini Review

Abstract

Breast cancer (BC) is the leading cause of cancer death among women worldwide after skin cancer. An increase of 23% to 27.9% of its incidence is estimated for 2012. As an important factor for tumor growth and development, angiogenesis has become a target for more efficient therapies against cancer. Antibody-based antiangiogenic drugs, treatments using hormone receptors that can influence the formation of blood vessels and molecular studies of Vascular Endothelial Growth Factor isoform control are the focus of innovative therapies and promise a longer survival and better quality of life for patients with BC. Many are already being used, albeit timidly, but with promising results. This paper seeks to show that angiogenesis inhibitors are being used in the treatment of BC in association with the medical clinic.

1. Breast cancer and angiogenesis

Breast Cancer (BC) is the second most common cancer in women after skin cancer and the leading cause of cancer death among women. It accounts for 23% of all cancers and 14% of deaths from the disease¹⁻³. One in every three cancers diagnosed in U.S. women is a BC². Breast, prostate, colorectal and lung cancer rates are 2 to 5 times higher in developed countries compared with developing countries¹.

This tumor type is a clinically heterogeneous disease, which requires a large variety of treatments and leads to different outcomes⁴. The current prognostic classification considers, in addition to histological subtypes, molecular subtypes⁵, characterized by the following phenotypes: **Luminal A** (estrogen

receptor (ER)-positive and/or progesterone receptor (PR)-positive, HER2-); **Luminal B** (ER⁺ and/or PR⁺, HER2⁺); **Basal like** (ER⁻, PR⁻, HER2⁻, cytokeratin 5/6⁺ and/or HER1⁺); **HER2 overexpression** (ER⁻, PR⁻, HER2⁺). Furthermore, in 2007, a new molecular subtype was identified, called "**claudin-low**" (claudin3,4,7^{low}/E-caderin^{low}). These molecular subtypes have different behaviors related to survival, prognosis and response to specific therapies⁶.

Despite the high incidence of breast cancer, early diagnosis and the introduction of more effective treatments have contributed to decreases in death rates and improvement of patients' quality of life⁷⁻⁸. However, patients often acquire resistance to a particular treatment, which enables the recurrence and/or tumor growth, invasion and metastasis⁹ which depicts the major causes of morbidity and mortality¹⁰.

In clinical practice, a group of patients might have the same diagnosis and receive the same or different therapeutic recommendations. The recommended course of therapy can be successful and still cause toxicity in some patients, but may only cause toxicity, without demonstrating any therapeutic benefit in others. Meanwhile, others may experience no effect, either harmful or beneficial. In the first place, prognostic tools are needed to identify patients who require treatment, as well as to identify patients who will benefit from specific treatments. The dosage is another critical aspect for personalized medicine¹¹.

The progressive transformation of a normal cell into a tumor cell is driven by a variety of genetic and epigenetic changes¹². Among these changes are tissue invasion and metastasis, and, importantly and sustained angiogenesis.

In the process of tumor growth, adhesion molecules, angiogenic stimuli, coagulation factors, proteases, and growth factors are involved¹³. The formation of new blood vessels is required for the maintenance of tumor growth¹⁴⁻¹⁶, since the existing vasculature is not enough to support the tumor¹⁷⁻¹⁸.

Although the process of angiogenesis is necessary for the growth and development of primary tumors and metastases, an increase in the level of angiogenic activity mainly favors the development of primary malignant tumor in breast cancer¹⁹⁻²⁰. Just as clinical presentation of the disease and prognosis are meaningful in the diagnosis and treatment of patients, the correlation between the levels of regulatory factors of angiogenesis become an attractive tool in modern medicine²¹.

Among factors that promote tumor angiogenesis is the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), which is produced and secreted by normal cells, with marked expression in tumor cells, including breast cancer. VEGF is capable of promoting a fast and complete formation of tumor vasculature, increasing capillary permeability¹³, which results in an important effect in the genesis, development, metastasis and recurrence process of various tumors²². Many studies seek a relationship between VEGF gene and predictive values and its predivite and prognostic values clinically²³.

Rykalaet et al. (2011) observed an increased level of VEGF gene expression in breast cancer when compared to benign breast tumors. Moreover, VEGF has also been associated with distant metastasis and with tumor progression^{13,21}. Assessment of angiogenic markers in tumors may assist in the choice of treatments and drugs more specific for patients with this type of cancer^{21,24}.

2. Angiogenesis and therapy in Breast Cancer

In 1971, Folkman (1971) postulated that inhibiting tumor angiogenesis could inhibit tumor expansion²⁵. Later, independent studies by other researchers as Ferrara and Henzel (1989), Senger (2010), Dvorak (2011), Connolly and colleagues (1991) led to the identification, purification, and cloning of VEGF, considered the key pro-angiogenic factor²⁶⁻³¹. Since then, research on molecular mechanisms of angiogenesis has steadily increased, allowing for the discovery of promising therapies for patients with cancer^{31;32}.

Tumor angiogenesis is now recognized as a hallmark of cancer. VEGF, Epidermal Growth Factor (EGF) and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) represent key factors in tumor angiogenesis. The introduction of antiangiogenic agents in the clinical practice was a landmark event in cancer therapy over the last decade³³.

Angiogenesis blockade in multiple myeloma (MM) bone marrow (BM) with Thalidomide, VEGF blockade with Bevacizumab, a first-line antiangiogenic drug, or EGF receptor (EGFR) blockade with Cetuximab in colorectal cancer (CRC) have established new anti-cancer strategies. Other second-line drugs such as Sunitinib, Sorafenib and Prazopanib have recently been released for the treatment of patients with cancer, including BC³³.

Some angiogenesis inhibitors indicated for the treatment of patients with BC in combination with conventional therapies are listed in Table 1.

Table 1. Summary of drugs, their revealed targets and indications in clinical trails (Fan et al. 2011, with modifications)

Anti-VEGF therapy has been shown to be effective against cancer³⁴ and other angiogenic conditions (Eyeteck Study Group 2003). In order to prevent the formation of new blood vessels within the tumor, such therapies can work two ways. First, by neutralizing VEGF with the recombinant human monoclonal antibody BEVAcizumab, which recognizes human VEGF-A ligands, eliminating the need of VEGF receptors (VEGF-R) and inhibits the activation of mitogenic signals and the growth of new blood vessels. Secondly, after the blocking signal transduction cascade with small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as Sorafenib and Sunitinib Sunitinib³⁵. (Figure 1).

For Di Domenico et al. (2011), therapies with angiogenic factor inhibitors such as VEGF may help treating patients with cancer in the future and even be used as an angio-inhibitor preventive therapy, less toxic and less susceptible to cellular drug resistance.

Despite these important discoveries, little is known about the regulation of different isoforms of VEGF³⁶. Multiple VEGF isoforms are generated by alternative splicing. The conventional VEGF isoforms result from the splicing of the pre-mRNA of eight exons, yielding at least seven types of mRNA and seven peptide species identified by the exon composition and the size of the amino acids in the final proteins³⁷.

The selection of an alternative site of splicing in the 3' end of exon 8 results in a family of sister isoforms, named VEGF_{xxx}b. The VEGF_{xxx}b isoforms have 94-98% homology with the isoforms VEGF_{xxx} and result from the selection of a distal splicing site in exon 8 of the C-terminal region of the pre-VEGF mRNA,

which determines the division into two sub-exons (exon 8a and exon 8b). Details of the molecular control of the choice of splicing site of the C-terminal region, as well as the pro-and anti-angiogenic balance are emerging themes³⁸. Whereas VEGF_{xxx} isoforms are pro-angiogenic and upregulated in tumors, VEGF_{xxx}b isoforms are described as anti-angiogenic and downregulated in tumor tissues, including prostate³⁷, colon³⁹, renal cell³⁶ carcinomas and melanoma⁴⁰. Furthermore, the expression of VEGF splicing variants is altered in microvascular angiogenic phenotypes in proliferative ocular disease in pre-eclampsia^{41; 42}. Thereby, the balance of the expression of VEGF isoforms, which is controlled by mRNA splicing, seems to lead the whole mechanism of angiogenesis³⁸.

Despite the evidences of an imbalance in the amount of pro and anti-angiogenic VEGF isoforms in a variety of diseases^{36; 37; 41- 43}, little is known about the cellular and molecular pathways that regulate alternative splicing of the VEGF pre-mRNA in general, and specifically in the 3' splice site of exons 8a/8b⁴⁴.

Figure 1. VEGF pathway and VEGF inhibitors (Di Domenico et al. 2011³⁶, with modifications)

Another important factor to be considered in tumor vascularization and metastasis is hypoxia. Epithelial cells require survival signals generated by the interaction of integrins with the extracellular matrix (ECM), and in the absence of such signals, cells undergo apoptosis. Zhu et al. (2013) showed that the inhibition of the expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in a cell line of skin cancer resulted in an increased susceptibility to apoptosis and also showed that ANGPTL4 promotes activation of ECM sensors⁴⁵.

The ANGPTL4 expression is induced by hypoxia in human breast cancer cells and is required for lung metastasis to succeed. However, further studies are proposed to determine whether ANGPTL4 actually protects breast cancer cells from hypoxic apoptosis⁴⁶⁻⁴⁷. Semenza (2013) describes that cancer cells, once in the bloodstream, even after reoxygenation, keep the hypoxic cell characteristics due to the high stability of proteins synthesized by HIF-1 during hypoxia. This persistent effect of HIF-1 proteins lead to an association between high expression of ANGPTL4 and lung metastasis in breast cancer⁴⁸.

3. VEGF and Breast Cancer

Assessment of angiogenesis in BC is a key indicator of survival and response to therapy⁴⁹. The newly formed blood vessels provide nutrients and oxygen to the tumor, increasing its spread. Thus, angiogenesis plays a key role in cancer progression and emergence of metastasis^{38;48;49}.

VEGF is part of a family of glycoproteins that includes VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and placental growth factor. However, the main mediator of tumor angiogenesis is VEGF-A, referred to as VEGF. The factors that contribute to the increased expression of VEGF in breast cancer are: low intracellular oxygen concentration, which blocks intracellular degradation of the hypoxia inducible factor (HIF-1 α), increasing its intracellular levels and leading to hypoxia, which increases angiogenic activity through transcriptional activation of the VEGF gene, and mutations in p53 suppressor gene (neovascularization modulator)¹³.

As an example of what happens in CRC and renal cell carcinoma (RCC), VEGF is also upregulated in BC, which leads to poor prognosis in^{50; 51}. In addition, high levels of VEGF in mammary tumors are correlated with intratumoural microvessel density (MVD) and high positive nodes⁵²⁻⁵⁵.

The production and secretion of VEGF in the microenvironment of BC is triggered by a series of stimuli, including growth factors, cytokines, hormones, p53 function loss and RAS mutations, SRC, hypoxia and overexpression of HER2 (HER2/neu, ErbB2)⁵⁶⁻⁵⁹. This entire process contributes to rupturing of the basement membrane, EM degradation, proliferation and migration of endothelial cells, vascular lumen formation and functional maturation characterizing metastasis¹³.

It has been observed that in premenopausal patients, VEGF levels are higher when compared with postmenopausal patients, suggesting an increase in VEGF expression by steroid hormones⁶⁰. An example of hormone-induced oversecretion of VEGF is the interaction of ER α / estradiol with an imperfect estrogen-responsive element in VEGF transcription start site^{61; 62}.

The existence of an alternative splicing site in the RNAm 3' untranslated region, which results in the expression of isoforms with a C-terminal region, may have differential inhibitory effects and are down-regulated in tumors, suggesting that the splicing control may be an important regulatory mechanism of angiogenesis in cancer³⁶. The study of the regulation of VEGF_{xxx}b isoforms may be a key mechanism to address the balance of angiogenic cancers⁶³.

Whereas VEGF_{xxx} isoforms are pro-angiogenic and upregulated in tumors, isoforms VEGF_{xxx}b are antiangiogenic and downregulated in tumor cells,

including melanoma⁴⁰, prostate carcinoma³⁷, colon carcinoma³⁹ and renal cell carcinoma³⁶. As for BC, Catena and colleagues (2011) found in their studies that VEGF_{xxx}b isoforms, unlike previously thought, do not act as antiangiogenic, but as poorly angiogenic forms of VEGF-A. The authors also found evidence that VEGF_{xxx}b isoforms, as well as total VEGF, are upregulated in breast tumor tissues compared with normal tissues⁶⁵.

Despite the evidences of an imbalance in the number of pro-and antiangiogenic isoforms of VEGF in a variety of tumors^{36; 37; 41-43}, little is known about the cellular and molecular pathways that regulate alternative splicing of VEGF⁴⁴.

4. Conclusion

Therapies involving the control of angiogenesis in BC have undergone major advances in recent years. The tools of molecular biology associated with clinical management have significantly improved tumor treatments, providing patients with BC with better quality of life. Drugs such as Bevacizumab, an antiangiogenic monoclonal antibodyve already been used in futuristic treatments, resulting in minor side effects to patients. Other strategies, such as studies of VEGF isoforms, may give rise to gene therapy which can subject the patient to less aggressive treatment. Such treatment can work through the use of cellular and molecular pathways, where the considered antiangiogenic isoforms would be reinforced by promoting a reduction in tumor irrigation. However, many studies involving the selection and splicing isoforms VEGF_{xxx}b still need to be done. Fortunately, science has effectively worked in the treatment of BC, providing patients with a greater prospect of survival. The study of angiogenesis associated with this tumor type has been of great

importance and can contribute to the success of new therapies against this tumor type.

Acknowledgement

Research Foundation of the State of São Paulo – FAPESP – for Financial Support.

Camila Takáo Lopes, RN, MsC, Doctoral student, for the English review.

References

1. Jemal A, Bray F, Center Mm, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):134.
2. Zhao X, Xu X, Zhang Q, Jia Z, Sun S, Zhang J, Wang B, Wang Z, Hu X. Prognostic and predictive value of clinical and biochemical factors in breast cancer patients with bone metastases receiving “metronomic” zoledronic acid. *BMC Cancer* 2011 11:403.
3. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin.* 2011 Nov-Dec;61(6):409-18. doi: 10.3322/caac.20134. Epub 2011 Oct 3. Review.Zhao 2011
4. Wei S, Liu L, Zhang J, Bowers J, Gowda Ga, Seeger H, Fehm T, Neubauer Hj, Vogel U, Clare Se, Raftery D. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Mol Oncol.* 2013 Jun;7(3):297-307.

5. Perou, C.M; Ursin, G; Kristensen, V.N; Borresen-Dale, A.L; Helland, A. Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features. *BMC Medical Genomic*, v.1, n.4, p.77, 2011.
6. Bernardi M. A; Logullo F.A; Pasini F.S; Nonogaki S; Blumke C; Soares F.A; Brentani M.M. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncology reports*, v.27, n.1, p.28-38, 2012.
7. Hicks D.G.; Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. v.132, p.1008-1015, 2008.
8. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2010.
9. Park S.Y.; Jang W.J.; Yi E.Y.; Jang J.Y.; Jung Y.; Jeong J.W.; Kim Y.J. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J. Pineal Res*. v.48, p.178-184, 2010.
10. Walker R.A., Jones J.L.; Chappell S.; Walsh T.; Shawn J.A. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metastasis Reviews*. v. 16, p. 5-27, 1997.
11. PEREZ EA. Breast cancer management: opportunities and barriers to an individualized approach. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:20-2.
12. Biselli-Chicote PM, Oliveira AR, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Nov 2

13. Jobim FC, Schwartzmann G, Xavier NL, Uchoa DM, Saciloto M, Chemello N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. *Rev Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2008. 30(6):287-93.
14. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic witch. *Nat Rev Cancer* 2003. 3:401–410
15. Shibata et al.: The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *BMC Medicine* 2010. 8:69.
16. Hashimoto A, Hashimoto S, Ando R, Noda K, Ogawa E, Kotani H, Hirose M, Menju T, Morishige M, Manabe T, Toda Y, Ishida S, Sabe H. GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. *PLoS One* 2011. 6(8):e23359. Epub 2011 Aug 15.
17. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000;55:15-35; discussion 35-6. Review
18. Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem.* 1991 Nov;47(3):219-23. Review.
19. Rahman, M. A., Toi, M., Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed. Pharmacother* 2003. 57, 463–470.
20. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000. 100(1):57–70.

21. Rykala J, Przybylowska K, Majsterek I, Pasz-Walczak G, Sygut A, Dziki A, Kruk-Jeromin J. Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathol Oncol Res* 2011. Dec;17(4):809-17. Epub 2011 May 11.
22. Su-Jie Zhang, Yi Hu, Hai-Li Qian, Shun-Chang Jiao, Zhe-Feng Liu, Hai-Tao Tao, Lu Han. Expression and Significance of ER, PR, VEGF, CA15-3, CA125 and CEA in Judging the Prognosis of Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013. Vol14 (6), 3937-3940.
23. Ch'ng ES, Jaafar H, Tuan Sharif SE. Breast Tumor Angiogenesis and Tumor-Associated Macrophages: Histopathologist's Perspective. *Patholog Res Int.* 2011;2011:572706. Epub 2011 Jun 15
24. Lord S, Harris AL: Angiogenesis - still a worthwhile target for breast cancer therapy? *Breast Cancer Research* 2010. 12(Suppl 4):S19.
25. J. Folkman, "Tumor angiogenesis: therapeutic implications," *The New England Journal of Medicine*, vol. 285, no. 21, pp. 1182–1186, 1971.
26. Ferrara N, Henzel WJ. "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989. vol. 161, no. 2, pp. 851–858.
27. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science*, vol. 246, no. 4935, pp. 1309–1312, 1989.

28. Senger DR. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol Biol Cell* 2010. Feb 1;21(3):377-9. PubMed PMID: 20124007; PubMed Central PMCID: PMC2814783
29. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol* 2011. May 1;103(6):468-74. doi: 10.1002/jso.21709. Review
30. Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 1991. Nov;47(3):219-23. Review.
31. Hanahan D, Folkman J. "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, vol. 86, no. 3, pp. 353–364, 1996.
32. Ellis LM; Hicklin DJ. "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity." *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 579–591, 2008.
33. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol*. 2012;2012:281261. Epub 2011 Aug 24.
34. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:427-34.
35. Pories GM. Evidence for the role of bevacizumab in the treatment of advanced metastatic breast cancer: a review. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. [Review]. 2010(2):37–44.

36. Di Domenico M, Ricciardi C, Fusco A, Pierantoni GM. Anti-VEGF therapy in breast and lung mouse models of cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:947928
37. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4123-31.
38. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO. VEGF165b, an inhibitory vascularendothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004. 64:7822–7835
39. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008; 8:880-7.
40. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A iso-forms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008. 98:1366–1379
41. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, Harper SJ, Bates DO. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer.* 2007 Jul 16;97(2):223-30. Epub 2007 Jun 26.
42. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan H Set al (2006) The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of

VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *ClinSci* 110:575–585

43. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48:2422–2427
44. Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y . Impaired glomerular maturation and lack of VEGF₁₆₅b in Denys-Drash syndrome. *J Am SocNephrol* 2007. 18:719–729
45. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J CellSci* 2008. 121:3487–3495
46. Zhang H, Wong CC, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, Chaturvedi P et al. HIF-1 dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 2012; 31:1757–1770.
47. Zhu P, Tan MJ, Huang RL, Tan CK, Chong HC, Pal M et al. Angiopoietin-like 4 protein elevates the pro-survival intracellular O₂:H₂O₂ ratio and confers anoikis resistance to tumors. *Cancer Cell* 2011. 19: 401–415.

48. Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene* 2013. Aug 29;32(35):4057-63.
49. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000. Jun 1;60(11):2898-905.
50. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000. 407:249-257.
51. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001. 19:1207-25.
52. L. Harris, S. Fox, R. Bicknell et al., "Gene therapy through signal transduction pathways and angiogenic growth factors as therapeutic targets in breast cancer," *Cancer*, vol. 74, no. 3, pp. 1021–1025, 1994.
53. Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, Molinaro AM, Rimm DL, Camp RL, Chung GG. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol* 2008. 39(12):1835–1843.
54. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004. 64(9):2941–2945

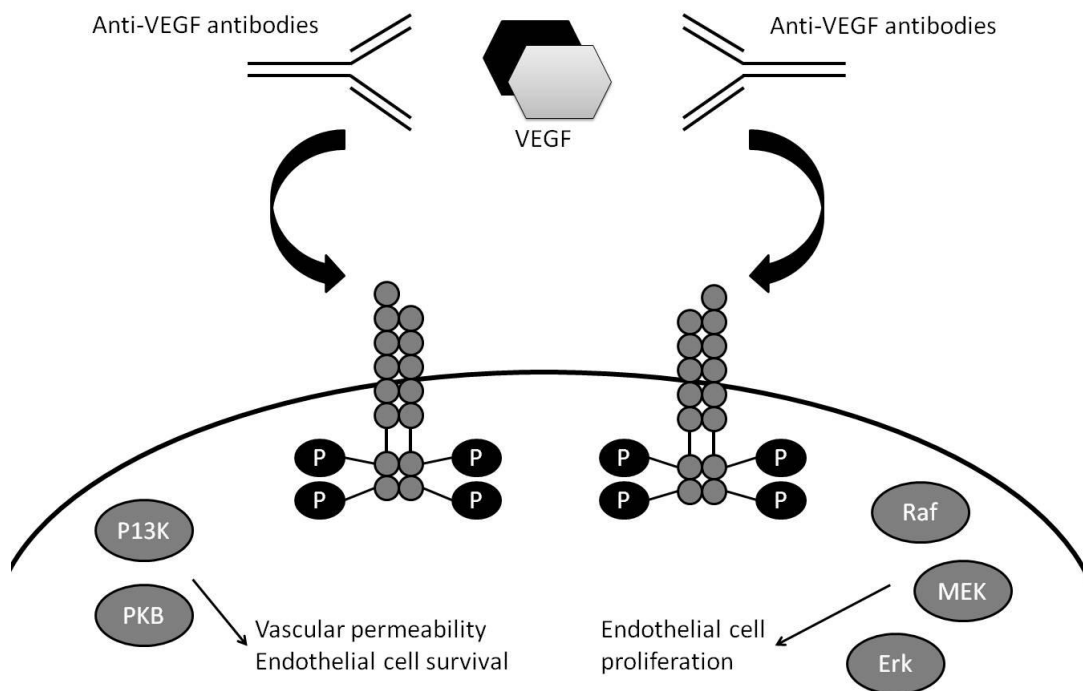
55. Ozalp S, Yalcin OT, Acikalin M, Tanir HM, Oner U, Akkoyunlu A. Microvessel density (MVD) as a prognosticator in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003. 24(3–4):305–308 6.
56. Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002. 5(2):123–127
57. Liang JT, Huang KC, Jeng YM, Lee PH, Lai HS, Hsu HC. Microvessel density, cyclo-oxygenase 2 expression, K-ras mutation and p53 overexpression in colonic cancer. *Br J Surg* 2004. 91(3):355–361
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
58. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C. “Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts,” *Cancer Research*, vol. 60, no. 2, pp. 490– 498, 2000.
59. Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ. “Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast,” *Clinical Cancer Research* 1999. vol. 5, no. 5, pp. 1041–1056.
60. Kimbro KS, Simons JW. “Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer,” *Endocrine-Related Cancer* 2006. vol. 13, no. 3, pp. 739–749.
61. Bhinder A. CS, Ramaswamy B. Antiangiogenesis therapy in breast cancer. *Current Breast Cancer Reports* 2010. 23-02-2010;2(1):17.

62. Greb RR, Maier I, Wallwiener D, Kiesel L. "Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions," *British Journal of Cancer* 1999. vol. 81, no. 2, pp. 225–231.
63. Mueller Md, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β ," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 20, pp. 10972–10977, 2000.
64. Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Appianat M. "Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors α and β ," *Cancer Research* 2002. vol. 62, no. 17, pp. 4977–4984.
65. Hilmi C, Guyot M, Pagès G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids* 2012. 2012:162692. Epub 2011 Oct 13.
66. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A. VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Molecular Cancer* 2010 9:320.

Drug (brand name, company)	Target	Approved	Indication
Bevacizumab (Avastin, Genentech/ Roche)	Monoclonal antibody against VEGFA	mCRC, mRCC, NSCLC, metastatic HER2-negative breast cancer, glioblastoma	Multiple solid tumors (e.g., RCC, BC, pancreatic, prostate, ovarian, brain cancers) and hematologic malignancies (e.g., MM)
Sunitinib, SU11248 (Sutent, Pfizer)	TKI of VEGFR 1-3, PDGFR α/β , c-kit, Flt3, RET, CSF-1R	mRCC, GIST	Multiple solid tumors (e.g., RCC, BC, melanoma, lung)
Pazopanib (Votrient, GlaxoSmithKline)	TKI of VEGFR 1-3, PDGFR α/β , c-kit tyrosine kinases	mRCC	Multiple solid tumors (e.g., BC, TCC, ovarian, lung) and others (e.g., lymphoma)
Sorafenib, BAY43-9006 (Nexavar, Bayer)	TKI of Multiple cell surface kinases (VEGFR 1-3, RET, PDGFR β , Flt-3, c-kit, CSF-1) and intracellular kinases (CRAF, BRAF, mutant BRAF)	mRCC, unresectable hepatocellular carcinoma	Multiple solid tumors (e.g., RCC, BC, melanoma, lung cancers) and hematologic malignancies (e.g., MM)
Bortezomib, PS-341 (Velcade, Millennium Pharmaceuticals)	26S proteasome inhibitor	MM, relapsed mantle cell lymphoma	MM, lymphoma, leukemia and multiple solid tumors (e.g., RCC, BC, lung, prostate)
Temsirolimus (Torisel, Wyeth)	mTOR inhibitor	mRCC	Multiple solid tumors (e.g., RCC, BC, melanoma, prostate, liver cancers) and hematologic malignancies (e.g., lymphoma)
Everolimus, RAD001 (Afinitor, Novartis)	mTOR inhibitor	Advanced renal cell carcinoma	Multiple solid tumors (e.g., BC, pancreatic, gastric cancers) and lymphoma
Axitinib, AG-013736 (Pfizer)	TKI of VEGFR 1-3, PDGFR β , c-KIT and CSF-1	No yet approved	mRCC, BC, NSCLC, metastatic pancreatic cancer, GIST, lung cancer, thyroid cancer
Icrucumab, IMC-18F1 (ImClone)	Monoclonal antibody against VEGFR-1	No yet approved	Advanced solid tumors, (e.g., CRC, BC, carcinoma of urinary tract)
Ramucirumab, IMC-1121b (ImClone)	Monoclonal antibody against VEGFR-2	No yet approved	CRC, BC, mRCC, Advanced liver, gastric, prostate, ovarian, and NSCL cancers, melanoma

Enzastaurim, LY317615HCl (Eli Lilly)	PKC inhibitor	No yet approved	BC, mCRC, Brain tumor, advanced NSCL, glioblastoma, lymphoma
Cediranib, AZD2171 (Recentin, AstraZeneca)	TKI of VEGFR 1-3	No yet approved	RCC, CRC, BC, ovarian, prostate cancer, lung, brain, head and neck cancers, glioblastoma, melanoma
Trastuzumab, herceptin (Genentech)	HER2 receptor	Gastric câncer, HER2 positive BC	BC, gastric
Tamoxifen, Novadex, Istubal, Valodex (AstraZeneca)	Estrogen receptor	BC	BC, bladder, melanoma, prostate

TKI: tyrosine kinase inhibitors; mCRC: metastatic colorectal cancer; NSCLC: nonsmall cell lung cancer; mRCC: metastatic renal cell carcinoma; GIST: gastrointestinal stroma tumor after progression; MM: multiple myeloma; BC: breast cancer; HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma.



ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo 2

Título: EXPRESSION ANALYSIS OF VEGF-A_{xxx} AND VEGF-A_{165b} ISOFORMS
IN BREAST CANCER

Autores: Rodrigo Castro; Patrícia Matos Biselli-Chicote; Tialfi Bergamin de Castro;
Leonardo Prado Stuchi; Newton Antonio Bordin Junior; Stephanie Piacenti dos Santos;
Érika Cristina Pavarino; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Eny Maria
Goloni-Bertollo

Periódico: Breast Cancer Research

Comprovante de submissão

Article title: Expression analysis of VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms in breast cancer

MS ID : 8804880131106872

Authors : Rodrigo Castro, Patrícia M Biselli-Chicote, Tialfi B de Castro, Leonardo P Stuchi, Newton A B Junior, Stephanie Piacenti dos Santos, Érika C Pavarino, Debora Aparecida PC Zuccari and Eny Maria Goloni-Bertollo

Journal : Breast Cancer Research

Dear Dr Castro

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://breast-cancer-research.com/imedia/8804880131106872_article.pdf (1118K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://breast-cancer-research.com/imedia/9277217031106880_comment.pdf

If deemed suitable, we will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@breast-cancer-research.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The Breast Cancer Research Editorial Team

EXPRESSION ANALYSIS OF VEGF-A_{xxx} AND VEGF-A_{165b} ISOFORMS IN BREAST CANCER

Rodrigo Castro^{1*}, Patrícia Matos Biselli-Chicote¹, Tialfi Bergamin de Castro¹, Leonardo Prado Stuchi¹, Newton Antonio Bordin Junior², Stephanie Piacenti dos Santos¹, Érika Cristina Pavarino¹, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari³ and Eny Maria Goloni-Bertollo¹

*Corresponding author: Rodrigo Castro rodrigocastro@famerp.br

¹ Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM) of São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), AV Brigadeiro Faria Lima, 5416 – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

² Department of Gynecology and Obstetrics, Base Hospital, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³ Laboratory of Molecular Cancer Research, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), AV Brigadeiro Faria Lima, 5416 – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Rodrigo Castro: rodrigocastro@famerp.br

Patrícia Matos Biselli-Chicote: patriciabiselli@famerp.br

Tialfi Bergamin de Castro: tialfi_@hotmail.com

Leonardo Prado Stuchi: prado_leonardo@yahoo.com.br

Newton Antonio Bordin Junior: bordinjunior@gmail.com

Érika Cristina Pavarino: erika@famerp.br

Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari: debora.zuccari@famerp.br

Eny Maria Goloni-Bertollo: eny.goloni@famerp.br

Abstract

Introduction: There are many studies on the role of Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) family in angiogenesis in various tumor types. Several studies attribute an anti-angiogenic condition to VEGF-A_{165b} isoform because its expression is decreased in tumor tissue and a pro-angiogenic condition to VEGF-A_{xxx} isoform because expression is increased in tumors. Our study examined the expression of VEGF-A_{165b} and VEGF-A_{xxx} isoforms in breast cancer and sought to associate the level of expression of these two isoforms to the current molecular subtypes and metastasis. To our knowledge, no study has conducted this association to date, which increases the importance of our results. **Methods:** The expression of VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms were analyzed in Real-Time quantitative PCR (PCRq) using samples from 50 patients with breast cancer and 43 adjacent normal tissue samples used as controls. Values of Relative Quantification (RQ) were associated with the molecular subtypes and metastasis. **Results:** High expression of both isoforms (VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b}) were present in tumors compared with normal tissue, but no significant difference was found when the expression of both isoforms was correlated. Our results show no association between VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms with the molecular subtypes. Only VEGF-A_{165b} isoform was significantly associated with metastasis ($p < 0,03$) when downexpressed in tumors. **Conclusion:** These data suggest that both VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms play a pro-angiogenic role in breast tumor tissues. However, VEGF-A_{165b} isoform seems to play this role less efficiently in breast cancer.

Keywords

Breast Cancer; VEGF, Alternative *Splicing*

INTRODUCTION

Breast cancer is now the leading cause of death by cancer among women in developing countries since the previous decade, when the major cause of death by the disease was cervical [1]. In Brazil, the incidence projected for 2013 is of 52.5 new cases per 100,000 women [2]. Because it is a clinically heterogeneous disease, each molecular subtype shows distinct behaviors related to survival, prognosis and response to specific therapies [3, 4].

Recent studies have shown that breast cancer has a poorer prognosis when associated with increased microvessel density. Besides, this increase is associated with highly malignant ductal carcinomas *in situ* [5]. The process of angiogenesis involves biochemical cascades of many different molecules, among which the Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A or VEGF) [6]. The role of VEGF in breast cancer becomes clear when increased synthesis of this growth factor is observed in breast cancer cell lines [7,8] as well as in breast cancer tissues [9].

Experiments *in vitro* and *in vivo* show that increased expression of VEGF-A is associated with tumor growth and metastasis, whereas the inhibition of this factor results in suppression of angiogenesis and tumor growth [6]. VEGF-A family is formed by multiple isoforms resulting from alternative splicing sites involving exons 6, 7 and 8 in normal and tumor tissues [10,11]. Alternative splicing of exon 8 results in two families of isoforms, VEGF-A_{xxx} and VEGF-

A_{165b}. Although they have the same number of amino acids, they present different C terminal sequences [12].

After the discovery of VEGF-A_{165b} family in 2002, several studies have analyzed the expression of this isoform in fresh human tissue, and most of those have evidenced that VEGF-A_{165b} isoform shown downexpressed when present in pathological conditions such as cancer [13]. Some authors characterize the VEGF-A isoforms VEGF-A_{xxx} as pro-angiogenic, whereas the isoforms VEGF-A_{165b} are generally regarded as anti-angiogenic [12,14-17] or with low angiogenic potential [18].

This study presents an analysis of the expression of VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms in breast cancer by real time quantitative PCR (PCRq). The results of the expressions were associated with the presence of metastasis and with molecular subtypes.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Fifty samples of tumor tissues and 43 adjacent tissues for direct control were collected at the surgical center of Hospital de Base, São José do Rio Preto, SP, Brazil, with the consent of the patient and signature of the consent form. In order to separate the tumor and the surrounding tissue without tumor cells, the samples were submitted to microdissection.

Classification of molecular subtypes

The current prognostic classification considers, in addition to histological subtypes, the molecular subtypes (PEROU et al, 2011), characterized in the

following phenotypes: Luminal A (estrogen receptor (ER) positive and/or progesterone receptor (PR) positive, HER2-), Luminal B (ER + and /or PR +, HER2+), Basal like (ER-, PR-, HER2-, cytokeratin 5/6 + and /or HER1+); overexpressed HER2 (ER-, PR-, HER2+). According to Aleskandarany et al. (2012), the subtypes Luminal A and Luminal B were grouped in Luminal Class.

Extraction of total RNA

Total RNA was extracted from breast tissue, cryopreserved by the method of Chomezynski and Sacchi's, 1996 [21], method using Trizol[®] reagent (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Reverse Transcription Reaction (RT-PCR)

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the commercial kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). In a 20 μ L-reaction, 2 μ g of total RNA deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) mix 1X, 1X RT random primers, 1X buffer and 1 μ l Multiscribe Reverse Transcriptase were used. In thermocycler, the reactions were submitted to 25 ° C for 10 min, 37 ° C for 120 min, and 80 ° C for 5 min.

Test for evaluation and selection of reference genes

In order to normalize the expression of VEGF-A mRNA regarding differences in the quantity and quality of RNA and efficiency of the reverse transcription reaction among the samples, five reference genes were assessed (*Applied Biosystems*: GAPDHPN4333764F; β -actin PN4333762F; *HPRT1* PN4333768F; *TBP* PN4333769F; and *RPLPO* PN4333761F). With the aid of

DataAssist 3.0 software (Applied Biosystems) was chosen two genes as endogenous controls for gene expression of the reactions of all samples. The selection of the best genes for endogenous controls was made by comparing the Cycle threshold (Ct) of the samples by DataAssist 3.0 software using the database of the logarithmic GeNorm, and genes with the lowest stability values (below 1.5) were chosen (RPLPO (0.6488) and HPRT1 (0.788)).

Gene expression analysis through real-time PCRq

PCRq reactions were performed in triplicate in 96-well plates in the equipment CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), using TaqMan MGB probes (Minor Groove Binder) linked to the fluorophore FAM (Applied Biosystems). TaqMan MGB probes containing the fluorophore FAM attached to the 5' end and a quencher connected to the non-fluorescent 3' end. The fluorescence intensity of the reaction was determined by calculating the ΔR_n ($\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$), where R_n^+ corresponds to the emission intensity of the fluorophore FAM / emission intensity of ROX at any given time, and R_n^- corresponds to the intensity of emission of the fluorophore from the probe / ROX emission intensity before amplification. The calculation of relative quantitation was done by method $2^{-\Delta\Delta C_q}$ described by Livak and Schmittgen, 2001 [22]. Normal tissue samples were used as calibrators. The software CFX Manager™ software, qbasePLUS was used to analyze curves.

Analysis of expression of the VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} isoforms

Fifty samples from a pool of tumors and normal tissue samples showed amplification for VEGF- A_{xxx} family. For normal samples, a pool containing equal amounts of 43 normal tissue samples was used. The primer set used detects isoforms 206, 189, 183, 165 and 148 of VEGF-A_{xxx}. The reactions were performed using TaqMan Gene Expression Master Mix 1x (Applied Biosystems), 300nM sense primer (5' AACACAGACTCGCGTTGCAA 3'), 100nM antisense primer (5' CGCCTCGGCTTGTCACAT 3') and 250nm TaqMan MGB 6-FAM probe (5' AGCTTGAGTTAAACGAAC 3'). Cycling comprised an initial stage at 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60° C for 1 min. In order to analyze the expression of VEGF-A_{165b} the same sense primer and probe VEGF-A_{xxx} were used, as described above. The antisense primer specific to the region 8b (5' TTCCTGGTGAGAGATCTGCAAGTA 3') was designed using the software PrimerExpress version 3.0 (Applied Biosystems) and detects only VEGF-A_{165b} isoform. The amplification reactions for VEGF-A_{165b} isoform were performed with 10ul of Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) , 900 nM of each sense and antisense primer and 250 nMTaqMan MGB 6-FAM probe . Cycling comprised an initial stage at 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 45° C for 1 min.

The calculation of the relative quantification of all the genes was made by method $2^{-\Delta\Delta Cq}$ described by Livak and Schmittgen in 2001[22]. Normal tissue samples (pool) were used as a calibrator and HPRT1 and RPLPO as reference genes. The software CFX Manager™, qbase^{PLUS} was used to analyze expression curves.

STATISTICAL ANALYSIS

Previous to the conduction of tests using continuous data, the normality of their distribution was tested using D'Agostino and Pearson normality test using the software GraphPadPrism v.6. The values of relative mRNA quantification (RQ) of VEGF-A isoforms in tumors was analyzed by *Mann Whitney test* (Table 1) and the comparison of the expression of the two VEGF-A isoforms in breast tumor tissues and normal tissue was performed through *Wilcoxon Signed Rank Test* (Table 2), since data did not present normal distribution. The associations between the expression of VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} with tumor metastasis and tumor phenotypes were analyzed using Binary Logistic Regression, where P values ≤ 0.05 were considered significant.

RESULT

Expression of isoforms and VEGF-A_{xxx} VEGF-A_{165b}

Significantly elevated expression of both VEGF-A isoforms, VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} was observed in breast tumors compared to adjacent normal tissue (Figures 1 and 2). The VEGF-A_{xxx} isoform in the breast tumor tissues presented RQ median = 7.73 when compared to normal tissue (Figure 3). For the VEGF-A_{165b} isoform, the average increase of expression in the tumor group was 2.9 times higher compared to normal tissue (Figure 4), which proves the overexpression of the two VEGF-A isoforms analysed in the breast tumor tissue (P=0,065).

The expression of VEGF-A_{165b} and VEGF-A_{xxx} by Mann-Whitney test, showed no significant difference in tumors (P=0.065) (Figure 5). The positive

correlation between the two isoforms (VEGF-A_{xxx} VEGF -A_{165b}) was confirmed (P <0.0001, r=0.71).

Figure 1. Increased expression of VEGF-A_{xxx} gene (Black) compared to the normal pool (Gray Arrow) analysed through PCRq.

Figure 2. Increased expression of VEGF-A_{165b} gene (Black) compared to the normal pool (Gray Arrow) analysed through PCRq.

Figure 3. Increased expression of VEGF-A_{xxx} compared to normal tissue (Calibrator; RQ=1)

Figure 4. Increased expression of VEGF-A_{165b} compared to normal tissue (Calibrator; RQ=1)

Figure 5. Comparison of the expression of VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} isoforms.

No association was found between the expression of VEGF-A_{xxx} gene and the molecular subtypes. There was also no relation between the overexpression of this gene with the process of tumor metastasis in breast cancer. For the VEGF-A_{165b} gene, no association with tumor phenotypes was found. However, downexpression of the VEGF-A_{165b} isoform was significantly associated with the metastatic process (OD=4.93; CI=1.03 23.63; p = 0.03) (Table1).

Table 1. Binary Logistic Regression. Relation between VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b} subtypes in breast cancer

	VEGF-A _{xxx}	VEGF-A _{165b}
SUBTYPES	P value	P Value
Luminal Class	0.863	0.099
Triple-negative Class	0.606	0.290
Her ₂ ⁺ Class	0.473	0.166

DISCUSSION

The present study has shown that in breast tumor tissue, VEGF-A_{165b} and VEGF-A_{xxx} isoforms exhibit high expression relative to normal breast tissue. In relation to isoform VEGF-A_{xxx}, other studies have also found an increased expression of this isoform in tumors, including prostate carcinoma[23], colon[24] renal cell carcinoma[12] and melanoma[25]. However, the finding of the present study concerning the VEGF-A_{165b} isoform does not confirm Bates et al. (2002)[12] who has demonstrated decreased expression of VEGF-A_{165b} in renal cell carcinoma and attributed an anti-angiogenic role for this isoform.

Studies also show decreased expression of VEGF-A_{165b} isoform in various types of cancer [12, 23-25, 29-32], therefore, the high expression of VEGF-A_{165b} in breast tumor tissue in this study suggests a differential contribution of this isoform in breast cancer. The study by Catena et al. (2010)[18] in breast cancer also demonstrated that VEGF-A_{165b} isoform as well as VEGF-A_{xxx} isoforms showed elevated expression in breast tumor tissue compared to normal tissue, suggesting a role for this pro-angiogenic isoform. Study in bladder carcinoma also showed overexpression expression of this isoform in tumor tissues[33].

Although the pro-angiogenic contribution of the VEGF-A_{165b} isoform in this study might be a plausible explanation for the overexpression expression in tumor tissues, its expression was decreased in the presence of metastasis. Pritchard-Jones et al. (2007)[25] in an experiment using primary malignant

melanoma also found an association between downexpression expression of VEGF-A_{165b} and metastatic spread, so it is possible that this isoform can be less efficient in the angiogenic process. Besides, other factors not assessed in this study, also can contribute to the metastatic process of breast cancer such as angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) that promote functional interactions with blood endothelial cells and is secreted by HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) in situation of the intratumoral hypoxia, similar to VEGF-A. In human breast cancer cells induced by hypoxia, ANGPTL4 is required for hematogenous metastasis to the lungs. Furthermore, ANGPTL4 was shown to bind and active integrins that interact with the extracellular matrix, such interaction is required for epithelial cells survival [37]. Zhu et al. (2013)[38] demonstrated in vitro that inhibition of expression of ANGPTL4 in cancer cell line skin caused an increased susceptibility to apoptosis. However, additional studies are required to determine whether ANGPTL4 protects hypoxia breast cancer cells from apoptosis, thus favoring tumor growth.

Both of these isoforms, VEGF-A_{165b} and VEGF-A_{xxx} presented expression in tumor tissue and, although the VEGF-A_{xxx} has shown higher expression compared to VEGF-A_{165b}, this difference was not significant. The highest expression of VEGF-A_{xxx} isoform was possibly due to the sequence of primers used in this study, which detects five isoforms (206, 189, 183, 165 and 148), while the sequence used for the VEGF-A_{165b} detects only this isoform. Moreover, some studies have shown that when the expression of both families (VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b}) occurs, the VEGF-A_{xxx} expression is prevalent in all tissues[34-36].

Regarding the analysis of molecular subtypes of breast tumors with the expression of the VEGF-A isoforms studied here, there was no association between the expression of VEGF-A_{165b} and VEGF-A_{xxx} with molecular subtypes of breast cancer. Nevertheless, to our knowledge there are no studies in the literature that analyzes the expression profile of VEGF-A_{165b} isoform in breast cancer with tumor phenotypic new classification, which makes this pioneer work in the molecular study involving family of VEGF-A in breast cancer. This shows that even with numerous studies of the VEGF- A_{xxx} and VEGF-A_{xxx}b is still necessary a better understanding of the function of these isoforms in the formation or inhibition of new blood vessels in pathological situations such as breast cancer.

In conclusion, results from this study suggest that both isoforms (VEGF-A_{xxx} and VEGF-A_{165b}) have pro-angiogenic role in breast tumor tissues. However, the VEGF-A_{165b} isoform seems to exert this function less efficiently, since it has decreased in the presence of metastasis.

List of abbreviations

ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
ASF/SF2	<u>Serine/arginine-rich splicing factor</u>
ATP	Adenosine Triphosphate
BC	Breast Cancer
cDNA	Complemetar Deoxyribonucleic Acid
CRC	Correctal Cancer
Ct	Cycle threshold

DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen Receptor
ESEs	Splicing Enhancers
FAM	Carboxyfluorescein
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (<i>São Paulo Research Foundation</i>)
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HIF-1	<u>Hypoxia-Inducible factors</u>
hnRNP	Heterogeneous Ribonucleoprotein Particles
HPRT-1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISEs	Splicing Intronic
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MVD	Microvessel Density
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PR	Progesterone Receptor
RCC	Renal Cell Carcinoma
RNA	Ribonucleic Acid

ROX	Homeobox Gene Family
RPLPO	Large Ribosomal Protein
RT-PCR	Real Time Reaction Chain Polymerase
SRFs	Splicing Regulatory Factors
SRp40	Splicing Regulatory Protein
SRp55	Splicing Regulatory Protein
SRPK	SR protein kinases
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBP	TATA Binding Protein
TKIs	Tyrosine Kinase Inhibitors
VEGF	Vascular Endotelial Growth FActor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The findings and conclusions in this letter are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the of Medicine of São José do Rio Preto.

Authors' contributions

RC wrote and developed the project at the practice and wrote the article. PMBC assisted in writing the project and writing the article. TBC aid in the development of techniques. LPS helped develop practical and preparation of the article. NABJ held the breast surgeries and participated in the data analysis. ECP aided design drafting and revising the article. DAPCZ co-supervised the

work and assisted in data analysis. EMGB supervised the research and assistance in writing the paper and corrections.

Acknowledgements

The authors wish to thank all those participating in this study and also the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for their financial support and FAMERP/FUNFARME for their collaboration in this work.

Camila Takáo Lopes, RN, MsC, Doctoral student and Gustavo Rodrigues Martins, Master student, for the English review.

REFERENCE

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics**, *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69–90.
2. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em <http://www.inca.org.br>.
3. Wei S, Liu L, Zhang J, Bowers J, Gowda GA, Seeger H, Fehm T, Neubauer HJ, Vogel U, Clare SE, Raftery D: **Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer**. *Mol Oncol* 2013, **7**:297–307.
4. Bernardi MA, Logullo FA, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, Brentani MM: **Prognostic significance of CD24 and claudin-7**

- immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol rep* 2012, **27**:28–38.
5. Ray A, Alalem M, Ray BK: **Loss of Epigenetic Kruppel-like Factor 4 Histone Deacetylase (KLF-4-HDAC)-mediated Transcriptional Suppression is Crucial in Increasing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Breast Cancer.** *J BiolChem* 2013, **6**:1–22.
 6. Ferrara N: **Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications.** *SeminOncol* 2002, **29**:10–14.
 7. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP: **Expression of vascular endothelial growth factor, itsreceptor, and other angiogenicfactorsin human breast cancer.** *Cancer Res* 1996, **56**:2013–16.
 8. Carmeliet P, Jain RK: **Angiogenesis in cancer and other diseases.** *Nature* 2000, **407**:249–257.
 9. Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, VanDam P, Colpaert CG, Fox SB, Turley H, Harris AL, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY: **Increased angiogenesis and lymphangiogenesisin inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:7965–71.
 10. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth**

- molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.***MolEndocrinol*1991, **5**:1806–14.
11. Harper SJ, Bates DO: **VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?***Nat Rev Cancer* 2008,**8**:880–87.
 12. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ: **VEGF-A165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma.***Cancer Res* 2002, **62**:4123–31.
 13. Bates DO, Mavrou A, Qiu Y, Carter JG, Hamdollah-Zadeh M, Barratt S, Gammons MV, Millar AB, Salmon AHJ, Oltean S, Harper SJ: **Detection of VEGF-A_{165b} Isoforms in Human Tissues.***PLoS ONE* 2013, **8**:e68399.
 14. Rennel ES, Harper SJ, Bates DO: **Therapeutic potential of manipulating VEGF splice isoforms in oncology.***Future Oncol* 2009, **5**:703–12.
 15. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO: **Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors.***J Cell Sci*2008, **121**:3487–95.
 16. Dokun AO, Annex BH: **The VEGF165b "ICE-o-form" puts a chill on the VEGF story.***Circ Res* 2011, **109**:246–47.
 17. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Ceccarelli C, Bellando-Randone S, Conforti ML, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M: **Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth**

- factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circul Res* 2011, **109**:14–26.**
18. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A: **VEGF121band VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A.** *Mol Cancer* 2010, **9**:320.
 19. Perou, C.M; Ursin, G; Kristensen, V.N; Borresen-Dale, A.L; Helland, A. **Gene expression profiles of breast biopsies from healthy women identify a group with claudin-low features.** *BMC Medical Genomic*, v.1, n.4, p.77, 2011.
 20. Aleskandarany MA, Green AR, Benhasouna AA, Barros FF, Neal K, Reis-Filho JS, Ellis IO, Rakha, EA: **Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**:R3.
 21. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**:156–59.
 22. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCt Method.** *Methods* 2001, **25**:402–8.
 23. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO: **VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice**

- variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004, **64**:7822–35.**
24. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S: **VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy.** *Br J Cancer* 2008, **98**:1366–79.
25. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, Harper SJ, Bates DO: **Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma.** *Br J Cancer* 2007, **97**:223–30.
26. Das K, Zhao Y, Sugiono M, Lau W, Tan PH, Cheng C: **Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder.** *UrolOncol* 2007, **25**:317–21.
27. Ferrara N, Henzel WJ: **Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells.** *BiochemBiophys Res Commun* 1989, **161**:851–58.
28. Ferrara N: **Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **280**:1358–66.
29. Hilmi C, Guyot M, Pagès G: **VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy.** *J Nucleic Acids* 2012, **2012**:1–7.
30. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, Hunter AJ, Soothill PW, Read M, Donaldson LF, Harper SJ: **The**

- endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF165b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term.** ClinSci(Lond) 2006, 110:575–85.
31. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ: **Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor.** Diabetologia 2005, 48:2422–27.
32. Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y, Miner JH, Leuschner I, Engers R, Everding AS, Bulla M, Royer-Pokora B: **Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome.** J Am SocNephrol 2007, 18:719–29.
33. Díaz R, Peña C, Silva J, Lorenzo Y, García V, García JM, Sánchez A, Espinosa P, Yuste R, Bonilla F, Domínguez G. **p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis.** Int J Cancer 2008; 123:1060-7.
34. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.**FASEB J 1999, 13:9–22.
35. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS: **Isoforms of vascular endothelial growth factor act in coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature.** Mol Cell Biol 2000, 20:7282–91.
36. Veikkola T, Alitalo K: **VEGFs, receptors and angiogenesis.** Semin Cancer Biol 1999, 9:211–20.

37. Semenza GL. **Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis.** *Oncogene* 2013. Aug 29;32(35):4057-63.
38. Zhu P, Tan MJ, Huang RL, Tan CK, Chong HC, Pal M et al. **Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O₂:H₂O₂ ratio and confers anoikisresistance to tumors.** *Cancer Cell* 2013. 19: 401–415.

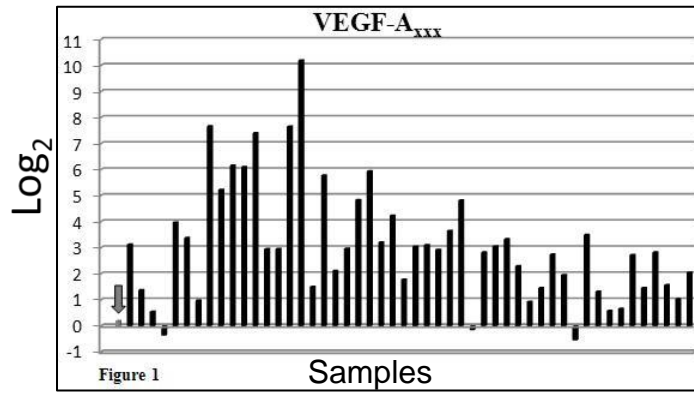


Figure 1

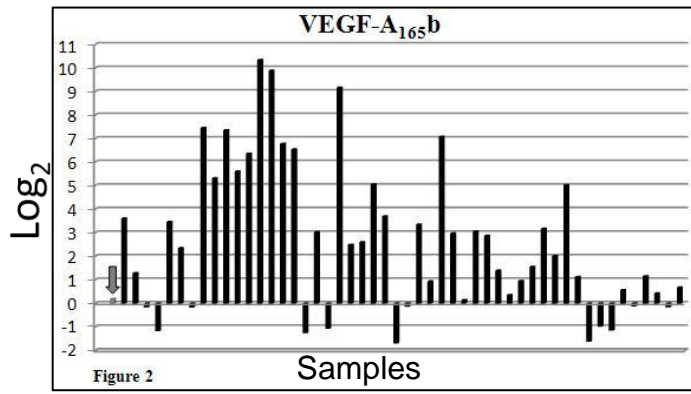
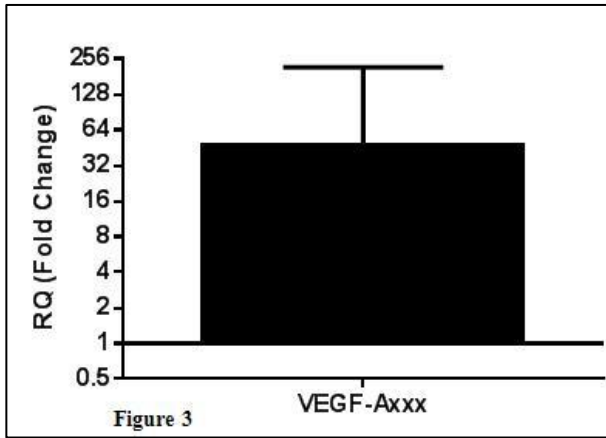
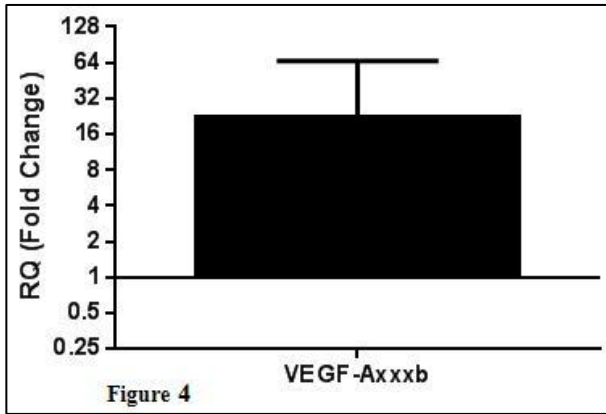
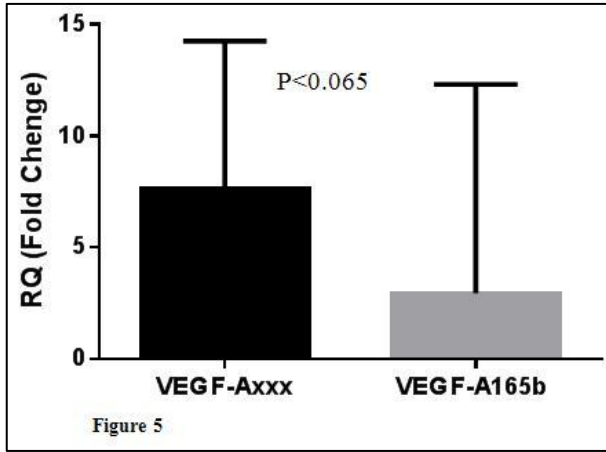


Figure 2







ARTIGO CIENTÍFICO 3

Artigo 3

Título: Contribuição de Fatores reguladores no mecanismo de *splicing* alternativo do gene VEGF-A

Autores: **Rodrigo Castro;** Patrícia M. Biselli-Chicote; Tialfi B. Castro; Leonardo P. Stuchi; Newton A. Bordin-Junior; Dalísio S. Neto; Stephaniei Piacenti dos Santos; Érika C. Pavarino; Debora A. P. C. Zuccari e Eny M. Goloni-Bertollo

Periódico: Molecular Biology Reports

Contribuição de Fatores reguladores no mecanismo de *splicing* alternativo do gene VEGF-A

Running Title: Splicing alternativo do gene VEGF-A em câncer de mama

Rodrigo Castro^{1*}, Patrícia M. Biselli-Chicote¹, Tialfi B. Castro¹, Leonardo P. Stuchi¹, Newton A. Bordin-Junior², Dalísio S. Neto³, Stephanie Piacenti dos Santos¹, Érika C. Pavarino¹, Debora A. P. C. Zuccari⁴ and Eny M. Goloni-Bertollo¹

⁽¹⁾ Genetics and Molecular Biology Research Unit (UPGEM) of São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

⁽²⁾ Department of Gynecology and Obstetrics, Base Hospital, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

⁽³⁾ Department of Pathology and Forensic Medicine, Base Hospital, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544 - São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

⁽⁴⁾ Laboratory of Molecular Cancer Research, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Correspondence to:

Rodrigo Castro

São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), Molecular Biology Department, Genetic and Molecular Biology Research Unit (UPGEM), Bloco U6. Avenida Brigadeiro Faria Lima, n° 5416, Vila São Pedro, Postal Code: 15090-000, São José do Rio Preto – São Paulo, Brazil.

E-mail: rodrigocstro@famerp.br

Phone: (55) 17 32015720 Fax: (55) 17 32015841

Conflicts of Interest: None declared.

Source of Funding: None declared

RESUMO

Introdução: Na última década um grande número de pesquisas sobre o funcionamento do *splicing* alternativo do gene *VEGF-A* tem chamado atenção com seus resultados de expressão de suas isoformas. Alguns sugerem que uma família deste gene denominada como *VEGF-A_{xxx}b* apresenta caráter anti-angiogênico, apresentando baixa expressão em tecidos tumorais enquanto a isoforma *VEGF-A_{xxx}* seria pro-angiogênica por apresentar um aumento de sua expressão em tumores. Nosso trabalho mostra que em câncer de mama a isoforma *VEGF-A₁₆₅b* apresenta uma expressão elevada quando comparado com tecido normal, divergindo da maioria dos autores. Além disso, relacionamos a expressão destas duas isoformas de *VEGF-A* com a expressão alguns fatores reguladores de *Splicing* (*SRPK1*, *SRp40*, *SRp55* e *ASF/SF2*), já que estudos mostram a associação destes fatores com a escolha de determinado sítio durante o *Splicing* do gene *VEGF-A* resultando na síntese de uma das duas isoformas. **Métodos:** A expressão das isoformas de *VEGF-A_{xxx}*, *VEGF-A₁₆₅b* e das proteínas reguladoras de *Splicing* foram analisadas em PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) utilizando amostras de 50 pacientes com câncer de mama e 43 amostras de tecido normal adjacente utilizados como controle. **Resultados:** Nós demonstramos expressão elevada das duas isoformas (*VEGF-A_{xxx}* e *VEGF-A₁₆₅b*) em tumores quando comparados com tecido normal ($P=0.001$ e $P=0.001$ respectivamente), porém não encontramos diferença significativa quando correlacionamos a expressão das duas isoformas ($P=0.065$). Houve expressão elevada de todas as proteínas reguladoras de *Splicing* quando comparadas com tecido normal ($P<0.0001$).

Encontramos também correlação positiva entre as duas isoformas de VEGF-A aqui analisadas e as proteínas reguladoras de *Splicing*. **Conclusão:** Os dados sugerem que tanto a isoforma VEGF-A_{xxx} quanto VEGF-A_{165b} apresentam papel pró-angiogênico em tecidos tumorais mamários. No entanto, a isoforma VEGF-A_{165b} parece exercer essa função de forma menos eficiente em câncer de mama. A expressão elevada das proteínas reguladoras de *Splicing* sugerem um associação com a expressão dessas isoformas do gene *VEGF-A*.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e apresentar grande capacidade de desenvolvimento de metástases[1]. Entre os vários tipos de neoplasias malignas, o carcinoma de mama é a frequente em mulheres em todo mundo[1-2], com incidência crescente[3] e no Brasil, é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979[4].

A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama no Brasil[5]. Estima-se que nas próximas décadas haja um grande aumento no número de mulheres diagnosticadas com câncer de mama e tratadas em países com recursos limitados[6].

O crescimento e progressão de tumores dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio vascular preexistente. Os tumores promovem a angiogênese por meio da secreção ou ativação de fatores angiogênicos, que estimulam a migração e proliferação endotelial e a morfogênese capilar. A avaliação da angiogênese no

câncer de mama é de grande importância como um indicador-chave para sobrevida e para resposta à terapêutica[7].

O processo de angiogênese envolve a ação de muitas moléculas em distintas cascatas bioquímicas, entre os quais o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-A ou VEGF)[8] que apresenta expressão elevada em células de tumorais da mama[9-10].

O VEGF-A parece ser o fator de crescimento vascular predominante na maioria dos tumores[11-12]. Duas famílias de isoformas de VEGF-A são geradas por meio da seleção de um sítio alternativo de *splicing* na extremidade 3' do éxon 8, e são denominadas VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{xxx}b (Figura 1). As isoformas VEGF-A_{xxx}b possuem 94-98% de homologia com as isoformas VEGF-A_{xxx}, no entanto parece não desencadear o processo angiogênico de forma eficiente[13]. Por esse motivo, tem sido sugeridas como fatores anti-angiogênicos em tumores, apresentando expressão reduzida nesses tecidos[11].

Além do *splicing* alternativo que seleciona a região C-terminal do éxon 8, a composição dos éxons dentro de cada família de VEGF-A origina pelo menos sete tipos de mRNA e sete espécies de peptídeos identificadas pela composição de éxons e tamanho de aminoácidos das proteínas finais[14]. As isoformas são nomeadas de acordo com o número de aminoácidos do monômero, como VEGF-A₂₀₆, VEGF-A₁₈₉/VEGF-A₁₈₉b, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₄₅/VEGF-A₁₄₅b, VEGF-A₁₄₈, VEGF₁₆₅/VEGF-A₁₆₅b, e VEGF₁₂₁/VEGF-A₁₂₁b.

Detalhes do controle molecular da escolha do sítio de *splicing* da região C-terminal de VEGF-A ainda não são totalmente conhecidos[13]. O mecanismo

de *splicing* é influenciado por fatores reguladores de *splicing* que selecionamos éxons a serem transcritos. Esses fatores incluem proteínas SR que contêm uma sequência de reconhecimento do RNA e um domínio rico em serina e arginina, tais como 9G8, ASF/SF2, SRp40, SRp55, entre outras[15].

Reguladores importantes do processo de *splicing* também incluem várias proteínas SR kinases que fosforilam os domínios serina-arginina encontrados em uma variedade de fatores de *splicing*, tais como as proteínas SR[16]. Experimentos *in vitro* mostraram que a fosforilação desses fatores é importante para seu transporte para dentro do núcleo e sua liberação dos sítios de estocagem nuclear[17-19]. Uma vez fosforiladas, as proteínas SR podem influenciar a seleção do sítio de *splicing* por mediar as interações entre os transcritos nascentes e os componentes do spliceossomo, um complexo de proteínas e RNA especializado formado durante o processo de *splicing*[20]. Em relação à regulação do mecanismo de *splicing* alternativo do gene *VEGF-A*, sabe-se que a proteína quinase SRPK fosforila ASF/SF2, o que favorece o *splicing* proximal e, portanto, a síntese de *VEGF-A_{xxx}*; já Clk1 resulta na fosforilação tanto de ASF/SF2 quanto de SRp55 e SRp40 [21-22], apresentando associação com a seleção de *splicing* distal e com a expressão de *VEGF-A_{xxx}b*.

Nosso trabalho analisa a expressão de duas isoformas de *VEGF-A* em tecido tumoral de mama em relação ao tecido normal e também a relação destas isoformas com os fatores reguladores de *Splicing* (SRPK1, SRp40, SRp55 e ASF/SF2) através da técnica de PCR quantitativa em Tempo Real.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 50 amostras de tecidos tumorais e 43 de tecidos adjacentes diretamente no centro cirúrgico do Hospital de Base de São José do Rio Preto, com consentimento da paciente e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa local. As amostras passaram pelo processo de microdissecção para obtenção de tecido que apresente a neoplasia e do tecido adjacente. Esse material foi identificado e armazenado em nitrogênio líquido até a extração do RNA total.

2.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

O RNA total foi extraído do tecido mamário, criopreservado, pelo método de Chomezynski e Sacchi (1996)[23], usando o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

As quantificações das amostras de RNA foram determinadas por sua absorbância em comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm pelo espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (*ThermoScientific*). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se o kit comercial *High-CapacitycDNA Reverse Transcription*, de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). Em uma reação de 20 μ l, foram utilizados 2 μ g de RNA total, desoxinucleotídeostriposfatados (dNTP) *mix* 1X, RT *randomprimers*1X, tampão 1X e 1ul de *Multiscribe Reverse Transcriptase*. Em termociclador, as reações foram submetidas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 80°C por 5 min.

2.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR Q-PCR

As reações foram realizadas em triplicata em placas de 96 poços no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), com a utilização de sondas *TaqMan* MGB (*Minorgroovebinder*) ligadas ao fluoróforo FAM (*Applied Biosystems*). Previamente à realização das quantificações de expressão dos genes alvo, foram avaliados 5 genes de referência (*Applied Biosystems*: GAPDH PN4333764F; β -actina PN4333762F; HPRT1 PN4333768F; TBP PN4333769F; e RPLPO PN4333761F) por meio do software *DataAssist 3.0* (*Applied Biosystems*), utilizando a base de dados logarítmica do GeNorm[24]. Os genes de referência que apresentaram menor variação entre os grupos de estudo e que foram selecionados para normalização dos dados de expressão gênica, de acordo com Vandesomepele *et al* (2002)[25], foram RPLPO e HPRT1. Os cálculos de quantificação relativa foram realizados pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen, em 2001[26].

2.3.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS VEGF-A_{xxx} E VEGF-A_{165b}

Cinquenta amostras de tumores e um *pool* de amostras de tecidos normais apresentaram amplificação para a família VEGF-A_{xxx}. Para as amostras normais foi utilizado um *pool* contendo quantidades equivalentes das 43 amostras de tecidos normais. O conjunto de *primers* utilizado detecta as isoformas 206, 189, 183, 165 e 148 de VEGF-A_{xxx}. As reações foram realizadas utilizando-se *TaqMan Gene Expression Master Mix 1x* (*Applied Biosystems*), 300nM de *primer* senso (5' AACACAGACTCGCGTTGCAA 3'), 100nM de

primer anti-senso (5' CGCCTCGGCTTGTCACAT 3') (e 250nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM (5' AGCTTGAGTTAAACGAAC 3'). A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para análise de expressão do VEGF-A_{165b}, foram utilizados o mesmo *primer* senso e sonda de VEGF-A_{xxx}, conforme descrito acima. O *primer* anti-sense específico para a região 8b (5'TTCCTGGTGAGAGATCTGCAAGTA 3') foi desenhado com auxílio do software *PrimerExpress* versão 3.0 (*Applied Biosystems*) e detecta somente a isoforma VEGF-A_{165b}. As reações de amplificação para isoforma VEGF-A_{165b} foram realizadas com 10ul de *Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystems*), 900 nM de cada *primer* senso e anti-senso e 250 nM de sonda *TaqMan* MGB 6-FAM. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 segundos e 45°C por 1 min.

2.3.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS FATORES REGULADORES DE SPLICING

Para análise da expressão de RNAs dos fatores reguladores de *splicing* *SRp55*, *SRp40* e *ASF/SF2*, foram desenhados pela empresa *Applied Biosystems* *primer* e sondas de acordo com as sequências do DNA complementar depositadas no *NCBI* (*SRp55*: NM_006275; *SRp40*: NM_001039465.1; *ASF/SF2*: NM_001078166.1). O ensaio *TaqMan Gene Expression Assays - Assay-on-Demand* (*Applied Biosystems*, Assay ID Hs00177298_m1) foi utilizado para análise do gene *SRPK1*.

As reações foram realizadas utilizando-se 100ng de cDNA, *TaqMan Gene Expression Master Mix 1x (Applied Biosystems)* e os *primers* e as sondas específicas para cada gene alvo, na concentração final de 1X. A ciclagem compreendeu um estágio inicial a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60°C por 1 min.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Anteriormente à realização de testes utilizando dados contínuos, os dados foram submetidos ao teste da normalidade de *D'Agostino e Pearson normality test* utilizando o programa *GraphPadPrismv.6*. Os valores de quantificação relativa de RNAm (RQ) das isoformas de VEGF-A e das proteínas reguladoras de *splicing* em tumores foi analisada por *Wilcoxon Signed Rank Test*, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal. Correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a correlação entre os níveis de expressão de RNAm entre as proteínas reguladoras e as isoformas de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b}, onde valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significantes (Tabela 2).

4. RESULTADO

4.1 EXPRESSÃO DE ISOFORMAS VEGF-A_{xxx} E VEGF-A_{165b}

Para determinar a expressão de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} em cancer de mama e tecidos normais, qPCR utilizando *primers* que distinguem as duas famílias de isoformas foi realizada. Expressão significativamente elevada de ambas as isoformas VEGF-A_{xxx} (mediana de RQ = 7.7; $P = 0.001$) e VEGF-A_{165b} (mediana de RQ = 2.9; $P = 0.001$) foi observada em tumores de mama em relação aos tecidos normais adjacentes (Figuras 1 e 2).

Para investigar qual das duas famílias de isoformas é mais expressa nos tumores, foram comparados os valores de expressão de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} por meio do *Mann-Witney Test*. VEGF-A_{xxx} apresentou expressão mais elevada em relação à VEGF-A_{165b}, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa (P=0,0654) (Figura 3).

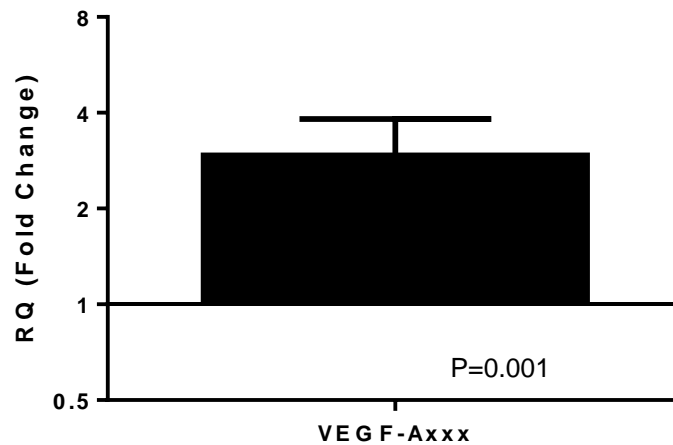


Figura 1. Expressão elevada de VEGF-A_{xxx} em tumores em relação ao tecido normal. O valor de RQ está apresentado em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

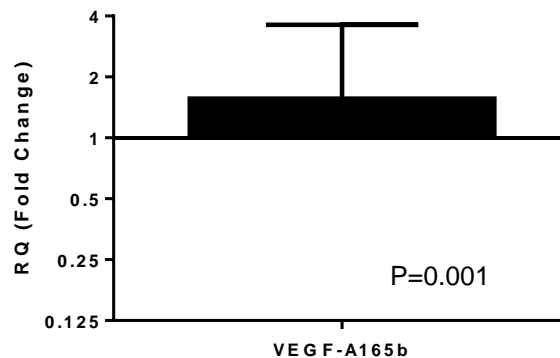


Figura 2. Expressão elevada do VEGF-A_{165b} em relação ao tecido normal. O valor de RQ está apresentado em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

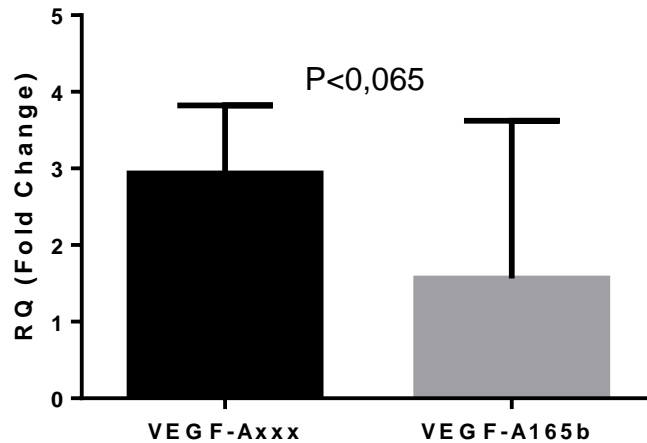


Figura 3. Expressão elevada das duas isoformas em tecidos tumorais em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

4.2 EXPRESSÃO DE FATORES REGULADORES DE *SPLICING*

A expressão do RNAm da proteína SRPK1 foi significativamente elevada em tumores de mama em relação aos tecidos normais ($P < 0,0001$) (Figure 4). Para ASF/SF2, SRp55 e SRp40 o RNAm também apresentou expressão significativamente elevada nos tumores ($P < 0,0001$) (Figura 5, 6 and 7).

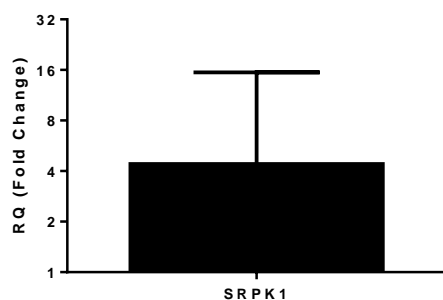


Figure 4. Expressão de RNAm de SRPK1 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

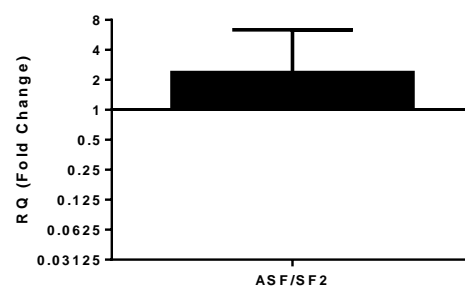


Figure 5. Expressão de RNAm de ASF/SF2 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

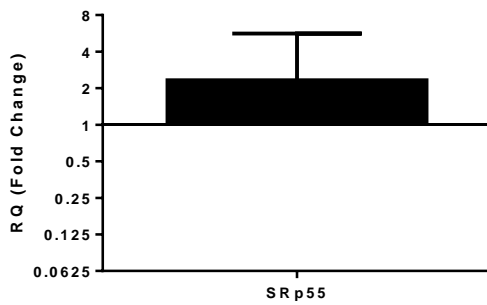


Figure 6. Expressão de RNAm de SRp55 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

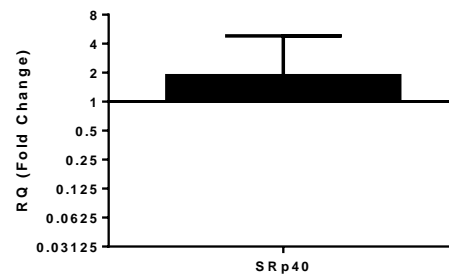


Figure 7. Expressão de RNAm de SRp40 em tumores de mama em relação aos tecidos normais. Os valores de RQ estão apresentados em escala logarítmica de base 2. Calibrador RQ = 1.

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE FATORES REGULADORES DE *SPLICING* E VEGF-A_{xxx} E VEGF-A_{165b}

As proteínas ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1 apresentaram correlação positiva com ambas as isoformas de VEGF-A (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação entre os fatores reguladores de *splicing* e as isoformas de VEGF-A em tumores

Fator regulador de <i>splicing</i>	VEGF-A _{xxx}		VEGF-A _{165b}	
	P value	r*	P value	r*
ASF/SF2	0.0001	0.5930	0.0001	0.6421
SRp55	0.0001	0.5773	0.0001	0.6832
SRp40	0.0001	0.6282	0.0001	0.7489
SRPK1	0.0013	0.4427	0.0001	0.5951

*Fator de correlação de Spearman

Correlação positiva também foi evidenciada entre a proteína SRPK1 e as proteínas SRASF/SF2, SRp55, SRp40 (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre SRPK1 e ASF/SF2, SRp55 e SRp40

Fator Regulador de <i>Splicing</i>	SRPK1	
	P value	r*
ASF/SF2	<0.0001	0,5748792
SRp55	<0.0001	0,4737014
SRp40	<0.0001	0,5615264

Discussão

Nossos resultados mostram expressão elevada da isoforma VEGF-A_{xxx} e da isoforma VEGF-A_{165b} em tecido tumoral de mama quando comparados com tecido normal. A expressão elevada da isoforma VEGF-A em tumores foi encontrada como resultado de vários trabalhos incluindo, carcinoma de próstata[14], cólon [27] e células renais[11], e melanoma[28]. O aumento da expressão de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} em câncer de mama aqui demonstrada, corrobora com resultados de Catena *et al.*, 2010[29], que também encontrou um aumento da expressão destas isoformas no mesmo tipo tumoral e discorda dos resultados de Bates *et al.*, 2002 [11] que encontrou uma expressão diminuída do VEGF-A_{165b} em carcinomas renais. Alguns autores sugerem que o VEGF-A_{165b} atua regulando o excesso de angiogênese durante condições de crescimento ou controlando a expressão de VEGF-A_{xxx}, uma vez que compete com esta última pela ligação ao receptor [30-31].

Foi observado que a isoforma VEGF-A_{xxx}b é capaz de induzir a fosforilação de VEGFR-2 e a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). Entretanto, a intensidade da resposta angiogênica foi menor em relação à VEGF-A_{xxx}. Assim, é possível que a

isoforma VEGF-A_{xxx}b possui atividade pró-angiogênica, mas com menor poder no mecanismo de angiogênese [29]. Para que possamos entender de forma mais eficiente o papel da angiogênese, pesquisas se mostram necessárias para o conhecimento do mecanismo de atuação das isoformas do gene VEGF-A [32].

Apesar da evidência de que existe um desequilíbrio na quantidade de isoformas pró e anti-angiogênicas de VEGF-A em uma variedade de doenças [11, 14, 31, 33; 34], pouco é conhecido sobre as vias celulares e moleculares que regulam o *splicing* alternativo do pré-mRNA de VEGF-A, especificamente do sítio de *splicing* 3'dos éxons 8a / 8b[35]. O *splicing* de éxons depende do equilíbrio das atividades das proteínas SR (*Serine-rich proteins*). Dados recentes sobre regulação de *splicing* das isoformas VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{xxx}b mostraram que os fatores ASF/SF2 e SRp40 favorecem a seleção de sítio de *splicing* proximal do pré-mRNA de VEGF-A, com consequente expressão da família VEGF-A_{xxx}, enquanto o fator SRp55 favorece a seleção distal, ou seja, a expressão de VEGF-A_{xxx}b. Foi observado que o fator SRp55 se liga a uma sequência de 35 nucleotídeos da região 3' não traduzida imediatamente depois da região *stop codon* no éxon 8b, e que a utilização de *small hairpin RNAs* (*shRNA*) para silenciar o fator SRp55 demonstrou uma significativa *downregulation* tanto de SRp55 quanto de VEGF-A₁₆₅b. Esses resultados indicam que fatores como ASF/SF2, SRp40 e SRp55, regulam o *splicing* alternativo do pré-mRNA de VEGF, determinando a região C-terminal[35].

RNA dos fatores reguladores de *splicing* investigados, ASF/SF2, SRp55, SRp40 e SRPK1, apresentam expressão elevada em tumores de

mama comparados com tecido normal. Correlação positiva foi evidenciada entre ambas isoformas de VEGF-A e todos os fatores de *splicing* avaliados. Esse resultado sugere que ambas famílias de isoformas de VEGF-A são significativamente expressas no tecido tumoral mamário com contribuição dos fatores de regulação investigados no mecanismo de *splicing* de VEGF-A.

A proteína quinase SRPK1 mostrou-se positivamente correlacionada com ASF/SF2, SRp55 e SRp40 nos tecidos tumorais. Atualmente sabemos que SRPK1 fosforila ASF/SF2, mas pode também fosforilar outros fatores, como SRp55. Além disso a regulação das proteínas SRs pode ser realizada por varios outros fatores conforme descrito por Prasad et al., (1999)[21] e Lai et al., (2003)[22].

Como conclusão, a expressão elevada de ambas as famílias de isoformas de VEGF-A em tumores de mama sugere a participação de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} na angiogênese tumoral. Além disso, é possível que ocorra uma interação entre os fatores reguladores de *splicing* para promover a expressão de ambas as isoformas de VEGF-A, contribuindo para o processo de desenvolvimento tumoral.

Agradecimentos:

Os autores gostariam de agradecer a todos aqueles que participam deste estudo e também à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a FAMERP / FUNFARME por sua colaboração neste trabalho.

Declaração de Divulgação

Os autores não têm qualquer conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- 1- Tavassoli FA, Devilee P, editors. (2003) Pathology and genetics of 3. tumours of the breast and female genital organs. Lyon: WHO/IARC; 2003.
- 2- Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [texto na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado 2006 Set 6].<Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>> acessado em 05 de setembro de 2013.
- 3- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108.
- 4- Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2002. Rio de Janeiro; 2003. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/23estimativas_incidencia.pdf> acessado em 05 de setembro de 2013.
- 5- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2013.

- 6- Agarwal G, Ramakant P, Forgach ER, Rendón JC, Chaparro JM, Basurto CS, Margaritoni M. (2009) Breast cancer care in developing countries. *World J Surg* 33:2069-76.
- 7- Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 2000 Jun 1;60(11):2898-905.
- 8- Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002, 29:10–14.
- 9- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
- 10- Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, VanDam P, Colpaert CG, Fox SB, Turley H, Harris AL, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY: Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 2004, 10:7965–71.
- 11- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ: VEGF-A165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002, 62:4123–31.

- 12- Bluff JE, Menakuru SR, Cross SS, Higham SE, Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease. *Br J Cancer*. 2009 Aug 18;101(4):666-72. Epub 2009 Jul 21.
- 13- Harper SJ, Bates DO: VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008, 8:880–87.
- 14- Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO: VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004, 64:7822–35.
- 15- Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO: Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007, 249:133–42.
- 16- Manley JL, Tacke R. SR proteins and splicing control. *Genes Dev* 1996; 10:1569–79.
- 17- Kuroyanagi N, Onogi H, Wakabayashi T, Hagiwara M. Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242:357-64.
- 18- Wang HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, et al. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 1998;140:737-50.

- 19- Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu XD. Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem* 2003; 278:18050-5.
- 20- Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J. Broad Specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; 78:37-88.
- 21- Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6991-7000.
- 22- Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J* 2003; 371:937-45.
- 23- Chomezynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156–59.
- 24- Schlotter YM, Veenhof EZ, Brinkhof B, Rutten VP, Spee B, Willemse T, Penning LC. A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 May 15;129(1-2):115-8. doi:10.1016
- 25- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0034.

- 26- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCt Method. *Methods* 2001, 25:402–8.
- 27- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S: VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008, 98:1366–79.
- 28- Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, Harper SJ, Bates DO: Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007, 97:223–30.
- 29- Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, Montes R, Pio R, Montuenga LM, Calvo A: VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 2010, 9:320.
- 30- Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt6):1207-13. doi: 10.1042/BST0371207
- 31- Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ: Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005, 48:2422–27.
- 32- Das K, Zhao Y, Sugiono M, Lau W, Tan PH, Cheng C. Differential expression of vascular endothelial growth factor165b in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol.* 2007 Jul-Aug;25(4):317-21.

- 33- Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, Hunter AJ, Soothill PW, Read M, Donaldson LF, Harper SJ: The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci(Lond)* 2006, 110:575–85.
- 34- Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y, Miner JH, Leuschner I, Engers R, Everding AS, Bulla M, Royer-Pokora B: Impaired glomerular maturation and lack of VEGF₁₆₅b in Denys-Drash syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18:719–29.
- 35- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO: Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008, 121:3487–95.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

1. Em tecidos tumorais encontramos expressão elevada das duas isoformas VEGF-A estudadas (VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b}) em relação ao *pool* de tecidos normais, porém a diferença de expressão de VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} não foi significativa em cancer de mama.

2. Não houve associação entre as isoforma VEGF-A_{xxx} e VEGF-A_{165b} e os subtipos moleculares dos tumores mamários.

3. Foi encontrada associação entre a baixa expressão da isoforma VEGF-A_{165b} e metástase.

4. Todas as proteínas reguladoras de *Splicing* (ASF/SF2, SRp40; SRp55 e SRPK1) apresentaram correlação positiva tanto com VEGF-A_{xxx} quanto com VEGF-A_{165b}.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 1. 2000;100(1):57-70.
2. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as 2. distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004;40(18):2667-75.
3. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2008. Rio de Janeiro; 2009. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/23estimativas_incidencia.pdf> acessado em 05 de setembro de 2009.
4. Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Helal AN, Chouchane L. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2006 Feb 20;6:38.
5. Sasco AJ. Breast cancer and the environment. *Horm Res*. 2003;60 18. Suppl 3:50.
6. Tavassoli FA, Devilee P, editors. Pathology and genetics of 3. tumours of the breast and female genital organs. Lyon: WHO/IARC; 2003.
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil [texto na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2005 [citado 2006 Set 6]. <Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>> acessado em 05 de setembro de 2009.

8. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
9. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2012. Disponível em:http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5, acessado em 05 de setembro de 2013.
10. Agarwal G, Ramakant P, Forgach ER, Rendón JC, Chaparro JM, Basurto CS, Margaritoni M. Breast cancer care in developing countries. *World J Surg*. 2009 Oct;33(10):2069-76.
11. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis 10. in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;51(3):195-208.
12. Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, Cairnduff F, Selby PJ, Perren TJ, Lansdown M, Banks RE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res*. 2000 Jun 1;60(11):2898-905.
13. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
14. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:1207-25.
15. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008; 8:880-7.

16. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29:10-4.
17. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4123-31.
18. Bluff JE, Menakuru SR, Cross SS, Higham SE, Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Angiogenesis is associated with the onset of hyperplasia in human ductal breast disease. *Br J Cancer*. 2009 Aug 18;101(4):666-72. Epub 2009 Jul 21.
19. Schneider BP and Miller KD. Angiogenesis of breast cancer, *J Clin Oncol* 2005; 23: 1782-90.
20. Ferroni P, Spila A, Martini F, D'Alessandro R, Mariotti S, Del Monte G. et al., Prognostic value of vascular endothelial growth factor tumor tissue content of colorectal cancer. *Oncology* 2006; 69:145-53.
21. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumor progression. *J Clin Pathol*. 1998 Oct;51(10):771-5.
22. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, et al., Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; 40: 321-5.

23. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851-8.
24. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1358-66. 25:581-611.
25. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:427-34.
26. Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 2003; 110: 979-86.
27. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004; 64:7822-35.
28. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev* 2004;
29. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 2007; 249:133-42.
30. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is

- differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008; 121:3487-95.
31. Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:2067-77.
32. Kamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. VEGF-A_{165b} is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of co-receptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 2008; 68:4683-92.
33. Qiu Y, Bevan H, Weeraperuma S, Wrattling D, Murphy D, Neal CR, et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J* 2007; 22:1104-12.
34. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S. VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 2008; 98:1366–79.
35. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2007; 97:223-30.
36. Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, et al. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF,

- VEGF_{xxx}b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci* 2006;110:575-85.
37. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005; 48:2422-7.
38. Rennel E, Waine E, Guan H, Schuler Y, Leenders W, Woolard J, et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF_{165b} inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 2008; 98:1250-7.
39. Schumacher VA, Jeruschke S, Eitner F, Becker JU, Pitschke G, Ince Y, et al. Impaired glomerular maturation and lack of VEGF_{165b} in Denys-Drash syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:719-29.
40. Misteli T, Caceres JF, Spector DL. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 1997; 387:523-7.
41. Caceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; 18:186-93.
42. Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J. Broad Specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; 78:37-88.
43. Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol* 1999; 19:6991-7000.

44. Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem. J* 2003; 371:937-45.
45. Chomezynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, 162:156–59.
46. Schlotter YM, Veenhof EZ, Brinkhof B, Rutten VP, Spee B, Willemsse T, Penning LC. A GeNorm algorithm-based selection of reference genes for quantitative real-time PCR in skin biopsies of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 May 15;129(1-2):115-8. doi:10.1016
47. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3:RESEARCH0034.
48. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCt} Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

6. ANEXOS



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

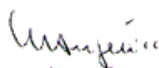
Parecer n.º 445/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo CEP n.º 6268/2009 sob a responsabilidade de **Rodrigo Castro**, com o título "Análise de expressão de isoformas pró-angiogênica e anti-angiogênica do gene VEGF e controle de Splicing em câncer de mama" está de acordo com a Resolução do CNS 196/96 e foi **aprovado por esse CEP**.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) **deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo**, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. **Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.**

São José do Rio Preto, 14 de dezembro de 2009.


Dr.ª **Maria Angélica Benes Teixeira Lemos**
Secretária do CEP/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: “ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE ISOFORMAS PRÓ-ANGIOGÊNICA E ANTI-ANGIOGÊNICA DO GENE *VEGF* E CONTROLE DE *SPLICING* EM CÂNCER DE MAMA”**Pesquisadores Responsáveis:** Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo – Geneticista - UPGEM - Coordenadora/ Prof. Dr. Dalisio de Santi Neto – Patologista/ Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari – Médica Veterinária -Biotério/ Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino – Geneticista- UPGEM Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista clínico/ Profa. Silvia Ap. Perea – Mastologista/ Prof. Alexandre Mansur Biscaro – Mastologista/ Prof. José Luiz Esteves Francisco - Mastologista

- A. Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida;
- B. O estudo tem como objetivo verificar o mecanismo de produção e ação de algumas proteínas que atuam na seleção de outras proteínas favorecendo ou impedindo a formação de vasos sanguíneos atuando diretamente no desenvolvimento tumoral. Podendo isso ser utilizado em futuras terapias na rotina dos tratamentos de neoplasias mamárias.
- C. Para isso, após a cirurgia para retirada do tumor será cortado deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para extração de material genético e proteína. . Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.
- D. Se eu concordar que um pedacinho do tumor retirado seja utilizado para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.
- E. Se eu não concordar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de nenhum modo, o meu tratamento nem a evolução da minha doença.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de aproximadamente 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetida a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do(a) participante:

Representante legal:

RG do prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional:

Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Rodrigo Castro – Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular - UPGEM
Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416
FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000
Fone: (17) 3201-5907
e-mails: rodrigocastro@famerp.br; newton_bordin@terra.com.br

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813.